

Etude critique de l'Electrophorèse de zone sur papier

*Application à l'analyse des protéines
extraites des tissus cancéreux*

(Travail du Laboratoire de Pharmacie Chimique et Pharmacologie de la
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon et du
Centre Régional Anticancéreux de Lyon et du Sud-Est).

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 13 Juillet 1955,

PAR

Jean-Jacques DUMONT

Né à St-Etienne, le 24 Novembre 1929.

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

J. PATISSIER

—
1955

**ETUDE CRITIQUE
DE L'ELECTROPHORÈSE DE ZONE
SUR PAPIER**

**APPLICATION A L'ANALYSE DES PROTÉINES
EXTRAITES DES TISSUS CANCÉREUX**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Etude critique de l'Electrophorèse de zone sur papier

*Application à l'analyse des protéines
extraites des tissus cancéreux*

(Travail du Laboratoire de Pharmacie Chimique et Pharmacologie de la
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon et du
Centre Régional Anticancéreux de Lyon et du Sud-Est).

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

(SECTION DE PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 13 Juillet 1955,

PAR

Jean-Jacques DUMONT

Né à St-Etienne, le 24 Novembre 1929.

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX

J. PATISSIER

—
1955

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire	M. J. LÉPINE
Doyen	M. H. HERMANN
Assesseur	M. J. GATE

Professeurs Honoraires

MM. NICOLAS, COLLET, CLUZET, BÉARD, GUIART, PIERY, CADE, PATEL.
LÉPINE, SAVY, TRILLAT, LÉRICHE, MOURIQUAND, MAZEL, LEULIER

Professeurs

Clinique médicale A.....	FROMENT
Clinique médicale B.....	P. KAVAUULT
Clinique chirurgicale A.....	SANTY
Clinique chirurgicale B.....	WERTHEIMER
Clinique Ophtalmologique.....	BONNET
Clinique urologique.....	CIBERT
Clinique et prophylaxie de la tuberculose.....	DUFORT
Clinique dermatologique et syphiligraphique.....	GATE
Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale.....	DECHAUME
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie.....	SEDALLIAN
Clinique chirurgicale orthopédique et infantile.....	GUILLEMINET
Clinique gynécologique.....	POLLOSSON
Clinique obstétricale.....	PIGEAUD
Clinique stomatologique.....	DUCLOS
Clinique médicale Infantile et Hygiène du 1 ^{er} Age.....	BERNHEIM
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	MAYOUX
Physiologie.....	HERMANN
Anatomie Pathologique.....	J. F. MARTIN
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	PONTHUS (<i>détaché à Beyrouth</i>)
Parasitologie et Pathologie exotique.....	GARIN
Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire.....	ROCHET
Chimie organique et toxicologie.....	CHAMBON
Pathologie générale et expérimentale.....	JOSSERAND
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	EELORE
Anatomie.....	GABRIELLE
Pathologie interne.....	CROIZAT
Chimie biologique et médicale.....	ENSELME
Pathologie chirurgicale.....	MAILLET-GUY
Histologie.....	NOEL
Pharmacie galénique et matière médicale.....	REVOL
Médecine du Travail.....	BOURRET
Thérapeutique.....	LEVYAT
Hygiène.....	SOHIER
Biologie médicale et pharmacodynamie.....	JOURDAN
Botanique et Cryptogamie.....	NETIEN
Propédeutique chirurgicale.....	BERTRAND
Chimie analytique Pharmaceutique.....	BADINAND
Pharmacie et Pharmacologie.....	DREVON
Médecine Légale et Déontologie.....	ROCHE

Professeurs titulaires sans chaire

Obstétrique	BANSSILLON -	Physique biologique	BERGER
-------------------	--------------	--------------------------	--------

Maîtres de conférences — Agrégés

Parasitologie	ROMAN	Biochimie médicale	CREYSSSEL R.
Parasitologie	COUDERT	Bactériologie	BERTOYE A.
Physiologie	CIER	Histologie	X...
Physiologie	CHATONNET		

Agrégés en exercice

Pathologie médicale	BRUN	Orthopédie	MARION J.
Pathologie médicale	GIRARD M.	Obstétrique	BROCHIEE
Pathologie médicale	GIRARD P.	Obstétrique	MAGNIN
Pathologie médicale	JEUNE	Obstétrique	MATHIEU J.
Pathologie médicale	VACHON	Anatomie	LATARJET
Pathologie médicale	GALY	Anatomie pathologique.	GUICHARD A.
Pathologie médicale	GONIN	Ophtalmologie	PAUFIQUE
Pathologie chirurgicale.	BÉARD	Dermato-syphiligraphie.	THIERS
Pathologie chirurgicale.	DESJACQUES	Urologie	PERRIN
Pathologie chirurgicale.	TRILLAT A.	Neuro-chirurgie	LECUIRE
Pathologie chirurgicale.	LARRY	Oto-Rhino-Laryngologie.	X...
Pathologie chirurgicale.	MANSUY	Médecine légale et médecine du travail.....	X...
Pathologie chirurgicale.	DARGENT		
Pathologie chirurgicale.	GUILLET		

Chargés des Fonctions de Maître de conférences — Agrégés

Hygiène	BENAZET	Pharmacie et Pharmacol.	CIER A.
Histologie	DUMONT L.	Chimie organique et toxicologie	PERROT L.
Physique biologique	MORET		

Examineurs de la Thèse

M. LEULIER, *Président* ;

MM. SANTY, DREVON, BADINAND et DARGENT, *Assesseurs*.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A MES PARENTS

*En témoignage de ma profonde
affection.*

2233571
2233571

A NOTRE PRÉSIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LEULIER

PROFESSEUR HONORAIRE
A LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. SANTY

PROFESSEUR DE CLINIQUE CHIRURGICALE
MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
MEMBRE NON RÉSIDENT DE L'ACADÉMIE DE CHIRURGIE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

MONSIEUR LE PROFESSEUR B. DREVON

PROFESSEUR DE PHARMACIE ET PHARMACOLOGIE
PROFESSEUR AGRÉGÉ DU VAL-DE-GRACE
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BADINAND

PROFESSEUR DE CHIMIE ANALYTIQUE PHARMACEUTIQUE
PHARMACIEN DES HÔPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M. DARGENT

CHIRURGIEN DES HÔPITAUX

Nos remerciements sincères vont à Monsieur le Professeur LEULIER qui nous a accueilli dans son Laboratoire de la Faculté pour l'accomplissement de ce travail et qui a bien voulu accepter la présidence de notre thèse. Nous sommes reconnaissant à notre Maître de nous avoir fait bénéficier de la richesse de son enseignement et de la profondeur de son expérience. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très vive gratitude.

Monsieur le Professeur SANTY, Directeur du Centre Régional Anticancéreux, a autorisé une collaboration sans laquelle il nous eût été impossible de mener à bien la deuxième partie de ce travail. Il nous a fait l'honneur d'être notre Juge. Nous lui présentons nos remerciements et l'assurance de notre respectueuse admiration.

Monsieur le Professeur DREVON a été l'instigateur de ce travail qu'il a conçu et dont il a suivi pas à pas la progression. Il a su rendre efficace notre étude en nous prodiguant sans cesse ses conseils avisés et en nous faisant partager son souci de précision et de rigueur dans l'expérimentation. Pour la formation qu'il a su nous donner et la sympathie qu'il nous a manifestée, qu'il veuille bien accepter nos remerciements et le témoignage de notre respectueux attachement.

Monsieur le Professeur BADINAND a dirigé nos débuts dans les Hôpitaux avant d'être notre Maître à l'Internat. Il a toujours été pour nous un conseiller bienveillant et un

guide précieux dans nos études. Nous le prions de bien vouloir trouver ici un témoignage de notre attachement et de notre très sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé DARGENT nous a réservé au Centre Régional Anticancéreux un accueil très cordial. Il s'est intéressé de près à nos recherches sur l'électrophorèse des tissus cancéreux, recherches qu'il a facilitées en effectuant lui-même les prélèvements et en nous procurant une documentation clinique précise. Nous lui présentons, avec nos plus vifs remerciements, l'assurance de notre entier dévouement.

Introduction

Les modifications protéiques qui se produisent au cours de la cancérisation au niveau des cellules tumorales ou dans le sang ont frappé tous les chercheurs. Certains même ont voulu voir dans ces altérations une « signature » de la maladie cancéreuse et se sont évertués à mettre en évidence, par les procédés les plus divers, certaines variations qu'ils considéraient comme spécifiques. Toutes les épreuves, tous les « tests » proposés depuis une trentaine d'années dans un but de diagnostic impliquent, de la part de ceux qui les ont proposés, la conviction que la tumeur évolue de telle sorte qu'elle engendre des protéines spéciales ou que sa croissance entraîne un réarrangement particulier des protéines habituelles. Il doit donc être possible de mettre en évidence ces altérations. Qu'on veuille les déceler par leur dosage ou par certaines de leurs propriétés immunologiques, la démarche de l'esprit est identique. Dans l'ignorance de la cause exacte du cancer, il semble même que cette façon de penser soit la seule possible.

Or, c'est aussi un fait d'expérience qu'aucun des nombreux tests proposés n'est satisfaisant. Dans la revue qu'il en a faite (17), l'inspirateur de ce travail a montré que les réactions considérées comme les meilleures avaient une « marge de sécurité » si faible qu'elle interdisait toute affirmation. D'autre part, il ne semble pas qu'apparaissent de protéines spéciales, ni de modifications *spécifiques* des protéines habituelles, ni d'augmentation de l'activité de certains enzymes.

On est frappé, en consultant l'abondante littérature cancérologique de constater que tout l'effort a porté sur l'étude des protéines du sérum alors que presque rien n'a été tenté pour élucider ce qui se passe au niveau même de la tumeur.

Ce travail répond au souci d'étudier — non sur l'animal de laboratoire cancérisé par des procédés toujours artificiels, mais directement sur les tumeurs spontanées de l'homme — les différences pouvant éventuellement exister entre la com-

position protéique du tissu tumoral et celle du tissu sain voisin.

Une dissection fine, faite par le chirurgien aussitôt après l'exérèse, permet d'ordinaire la dissociation des deux sortes de tissus dont l'examen histologique précise, s'il est besoin, la nature exacte.

Pour mener à bien ce travail, il était indispensable que nous puissions utiliser la méthode électrophorétique. Mais il n'était pas question, puisque nous opérions sur biopsie, d'employer la méthode classique de TISELIUS. Elle demande, en effet, des prélèvements très abondants, une extraction préalable des protéines et leur purification par dialyse prolongée. Outre l'impossibilité matérielle, c'eût été allonger exagérément les détails d'exécution de ce travail déjà long. L'emploi de la microélectrophorèse, si elle pallie le premier inconvénient, supposait des dispositifs onéreux que nous ne possédions pas. Nous avons donc fait choix de l'électrophorèse de zone sur papier, à laquelle TISELIUS lui-même accorde aujourd'hui sa faveur. Il nous a fallu cependant étudier de très près les conditions de son emploi : contrairement à notre espoir, l'électrophorèse sur papier ne nous a pas dispensés de l'isolement préalable des protéines. Du moins nous a-t-elle évité les longues dialyses nécessaires dans l'électrophorèse classique.

L'étude critique du mode opératoire et des conditions qui assurent le maximum de précision occupent toute la première partie du travail ; cette étude a été faite sur le sérum, en raison des recoupements nombreux que nous pouvions trouver dans la littérature et de l'appui que ces renseignements pouvaient apporter à nos efforts. Nous avons, chemin faisant, simplifié le mode opératoire et en quelque sorte proposé une « normalisation » que beaucoup ont adoptée.

Une fois précisée la marche analytique correcte, nous avons pu l'appliquer à résoudre le problème posé. En somme, nous avons suivi la démarche normale que nos prédécesseurs au laboratoire de Pharmacologie Chimique et au Centre Anticancéreux avaient déjà adoptée. En *isolant* des protéines, en les *caractérisant*, et en les *dosant*, grâce à leurs propriétés physico-chimiques, nous avons surtout fait œuvre de chimiste et d'analyste. Mais un outil une fois forgé doit servir et la deuxième partie de cette thèse témoigne de ce souci d'efficacité.

Il va de soi que ce travail n'est qu'une tentative pour rechercher s'il fallait ou non s'engager dans la voie que nous avons précisée plus haut. Les faits très nets que nous avons pu mettre en évidence appellent une étude plus approfondie : d'autres la poursuivent déjà.

Première Partie

L'ELECTROPHORÈSE SUR PAPIER

L'ÉLECTROPHORÈSE — BREF HISTORIQUE

Méthode physico-chimique, initialement conçue pour l'étude des protéines, l'électrophorèse permet de résoudre la plupart des problèmes généraux qui préoccupent le chimiste, à savoir : la détection, l'isolement et le dosage des constituants protéiques d'un mélange.

Nous rappellerons très brièvement les principales étapes qui ont marqué les applications de l'électrophorèse.

Les protéines en solution sont susceptibles de se mouvoir sous l'influence d'une force électromotrice appropriée en captant des charges électriques. QUINCKE en 1859 et OSTWALD ont dénommé respectivement ce phénomène de migration : cataphorèse et anaphorèse. TISELIUS en 1937 (58) l'applique à l'étude des solutions de protéines et décrit son appareil classique à cuve en U que modifieront SVENSSON (56) (57) et PHILPOT. Cependant, les travaux sur la chromatographie suggèrent la mise au point de l'électrophorèse sur papier-filtre. TISELIUS, lui-même, l'adopte (59) et l'étudie avec KUNKEL (36) et CREMER (14). On peut citer également les travaux importants de DURRUM (21), de SCHNEIDER (51), de GRASSMAN, HANNIG et KNEDEL (28), (29), de MACHEBOEUF, REBEYROTTE et Mlle BRUNERIE (40), de ARDRY (5) et de VAN OS (60).

De nombreux auteurs, dont ARDRY (7), (4), ont établi la comparaison entre les résultats de l'électrophorèse et ceux obtenus avec les autres techniques de séparation des protéines : relargage, précipitation par le sulfite de sodium.

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu étudier avec quelque détail la technique d'électrophorèse

sur papier que nous désirions appliquer. Cette technique peut apparaître de prime abord comme bien établie ; en fait, les modes opératoires conseillés varient sur de nombreux points de détail et nous avons pu nous persuader qu'il n'était pas indifférent à l'exactitude des résultats d'adopter les uns ou les autres. Chaque point doit donc faire l'objet d'une étude critique, et la « normalisation » finale du mode opératoire est la seule garantie de la reproductibilité des mesures. On ne sera donc pas surpris de la place donnée à cette enquête nécessaire sur la pratique et la portée de l'électrophorèse sur papier.

TITRE I

Recherches expérimentales sur la valeur de la méthode

La conduite d'une électrophorèse, jusqu'au résultat final exprimé par le pourcentage de chacune des fractions séparées, et, si possible, par leur « mobilité », peut être divisée en trois parties distinctes :

1. L'application de la technique proprement dite, succession de manipulations aboutissant au tracé de la courbe d'électrophorèse.

2. La détermination des « positions » et « mobilités » permettant l'identification des fractions.

3. L'évaluation de leurs proportions.

Nous envisagerons donc dans les trois premiers chapitres de ce travail :

1° L'étude de certaines conditions opératoires se rapportant :

- a) Aux solutions-tampon.
- b) A la concentration de la solution à étudier.
- c) A la position des bandes dans les cuves.
- d) Aux opérations de coloration et photométrie.

2° L'étude de l'identification des fractions.

3° L'étude de la valeur de la planimétrie en tant que moyen de fixer le taux des différents constituants protéiques des mélanges.

Appareillage.

L'appareillage que nous utilisons est celui construit par la firme Elphor, selon les données de GRASSMANN et HANNIG (28), (29).

Il comprend :

1. Un redresseur de courant comportant un interrupteur et un voltmètre permettant de régler à 110 V. la tension du courant d'alimentation.
2. Trois cuves d'électrophorèse, chacune étant munie d'un support pouvant recevoir deux bandes de papier-filtre.
3. Un photomètre pour la lecture des bandes.
4. Une batterie d'accumulateurs pour l'alimentation du photomètre. Nous avons donné la préférence aux batteries au Cadmium-Nickel à électrolyte alcalin.
5. Un redresseur de courant oxycuivre pour la recharge de la batterie.

Matériel accessoire et réactifs.

- 1) Papier Whatman n° 1. Bandes de $3,8 \times 28,3$ cm.
- 2) Pipette de précision de 10 mm³, graduée en mm³.
- 3) Mélange d'huile de paraffine et d' α -bromonaphtalène pour rendre le papier transparent (1).
- 4) Mélange méthanol-acide acétique :

Acide acétique glacial		1 partie
Méthanol		9 parties
- 5) Solution saturée de noir amide 10 B :

Noir amide 10 B		2 g.
Mélange (4) méth.-acét.		200 ml.

Cette solution doit contenir un excès non dissous de noir amide qu'il est préférable d'éliminer par filtration sur papier au moment de l'emploi.

(1) Commercialisé sous le nom de Transparenzol.

CHAPITRE I

Etude des conditions opératoires

Nous supposerons connues les conditions générales d'une électrophorèse sur papier et examinerons successivement :

1. Le choix de la solution-tampon.
2. La concentration de la solution protéique.
3. L'influence de la position des bandes dans les cuves.
4. La coloration et la photométrie.

I. — CHOIX DE LA SOLUTION-TAMPON

Préparation.

Nous avons employé deux sortes de solutions-tampon dont voici les formules :

A) *Tampon n° 1 aux phosphates* de pH = 7,15 et de force ionique $\mu = 0,13$ (11) :

Phosphate disodique 2OH_2	0,023 M	soit : 4,095 g./litre
Phosphate monopotassique	0,01 M	» : 1,361 »
Chlorure de potassium	0,05 M	» : 3,727 »

B) *Tampon n° 2 au véronal et acétate* de pH = 8,6 et de $\mu = 0,1$ (44) :

Véronal sodique	29,428 g.
Acétate de sodium crist.	19,428 g.
Solution décimormale de ClH	180 ml.
Eau distillée	q.s.p. 3 litres

Vérification du pH (1).

Nous avons mesuré les différences de pH se produisant au sein du tampon véronal-acétate après une électrophorèse de 14 heures.

Compartiment central Chambre à électrodes

Côté Anode	pH = 8,6	pH = 8,3
Côté Cathode	pH = 8,7	pH = 10,6

Si l'on mélange alors les solutions-tampon contenues dans chacun des compartiments, le pH trouvé est de nouveau de 8,6.

On constate ainsi l'efficacité de la cloison séparant la chambre à électrodes du compartiment où trempent les extrémités des bandes. Pour compenser les modifications de pH se produisant près des électrodes, on inverse les pôles de la cuve à chaque électrophorèse.

Conservation des solutions-tampon.

Les solutions-tampon ainsi préparées et vérifiées se conservent difficilement à la température ordinaire. Elles présentent au bout de quelques jours un trouble important qui cède cependant à la filtration.

Nous avons essayé la conservation au frigidaire en flacons stérilisés pendant 3 heures à 120° (chaleur sèche), bouchés émeri et paraffinés. Le pH vérifié au moment de la préparation était rigoureusement de 7,15 pour le tampon aux phosphates et de 8,6 pour le tampon véronal-acétate. Après deux mois de conservation, le tampon phosphaté n'était pas altéré et avait toujours un pH égal à 7,15. Par contre, le tampon véronal-acétate présentait un dépôt important et accusait un pH de 9. Si la conservation d'un tampon phosphaté est relativement aisée, par contre celle d'un tampon au véronal est fort délicate.

Pour éviter toute altération, les cuves d'électrophorèse sont vidées entre chaque opération et le tampon est, pendant ce temps, conservé à la glacière. Quelle que soit sa fréquence d'utilisation, il est renouvelé tous les 8 jours.

(1) Toutes nos vérifications de pH ont été faites à l'aide du potenti-pH-mètre système CARPENI-CONSTANT, Ets Jouan, constructeurs.

Choix d'une solution-tampon.

L'électrophorèse d'un sérum doit être faite en tampon véronal-acétate de pH = 8,6 (5) si l'on veut effectuer commodément la séparation de 5 fractions : albumines, globulines α_1 , α_2 , β et γ . Le tampon aux phosphates de pH = 7,15 ne permet pas toujours de distinguer α_1 et α_2 globulines. Nous verrons cependant l'avantage qu'il y a à l'utiliser pour l'extraction et l'électrophorèse des protéines tissulaires (voir 2^e partie).

Nous avons par ailleurs constaté que, selon que l'électrophorèse est conduite avec l'une ou l'autre de ces solutions-tampon, l'intensité du courant d'électrolyse, prise aux électrodes, est différente :

$$\frac{\text{DIFFÉRENCE DE POTENTIEL} = 110 \text{ V.}}{\text{INTENSITÉ}}$$

Tampon phosphates Tampon vér.-acét.

1 seule bande dans la cuve	2,2 mA	1,5 mA
2 bandes dans la cuve	4,2 mA	2,5 mA

La solution-tampon servant à l'électrophorèse doit donc être appropriée à la nature des protéines à étudier. De plus, la conservation difficile du tampon au véronal nécessite son renouvellement tous les 8 jours.

II. — CONCENTRATION DE LA SOLUTION PROTÉIQUE

La quantité de *sérum* à utiliser varie de 6 à 8 mm³ selon les auteurs (pour une coloration au noir amide).

Pour notre part, nous préférons une quantité légèrement supérieure : 8 à 10 mm³ (8 mm³ est particulièrement indiqué). Le choix de la prise d'essai est important ; de lui dépend l'obtention de bons diagrammes, ni trop ni pas assez colorés.

Nous avons voulu préciser les limites dans lesquelles l'électrophorèse sur papier permet de retrouver une protéine donnée. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences avec des solutions de plus en plus diluées d'albumine lyophilisée isolée par la méthode de Coix (fraction V). La teneur en albumine de chacune de ces dilutions a été déterminée par un dosage d'azote.

EXPÉRIENCES N^{os} 1 A 9 ET 175 (I à VI).A) Vérification du taux d'azote de l'albumine de Cohn
(qui contient une certaine quantité de ClNa).

Nous réalisons une solution-mère d'albumine à 50 g./litre par dissolution lente de 5 g. d'albumine lyophilisée dans une solution de ClNa à 9 % en ballon de 100 ml. que l'on remplit jusqu'au trait de jauge. A partir de cette solution-mère, on prépare différentes dilutions. Sur chacune d'elles, on effectue un dosage d'azote par la technique de MARKHAM :

Mode opératoire.

1) La prise d'essai doit renfermer de 0,020 à 0,150 mg. d'azote. Elle doit donc être comprise entre 0,135 mg. et 1,012 mg. d'albumine si l'on utilise 6,55 comme coefficient de transformation de l'azote en albumine (1).

La prise d'essai choisie correspond à environ 0,500 mg. de protéines.

2) Catalyseur de minéralisation de SISLEY (3,80 g. de SO_4Cu et 50 g. de SO_4K_2) utilisé à raison de 0,54 g. en présence de 1 ml. de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$.

3) Distillation dans l'appareil de MARKHAM. Le volume du liquide à distiller ne doit pas dépasser 8 ml. Opérer en présence de 2 ml. de NaOH à 40 %. Recueillir 8 à 10 ml. de distillat dans $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}/100$.

4) Titrage en retour par NaOH N/100 en présence d'indicateur au rouge de méthyle et bleu de méthylène de formule :

Solution alcoolique de rouge de méthyle à 0,1 % : 4 parties

Solution alcoolique de bleu de méthylène à 0,1 % : 1 partie

		Concentr. initiale en Albumine ‰	Azote ‰	Albumine ‰ trouvée = Azote $\times$ 6,55
Solution-mère		50	7,34	48,10
» diluée au	1/2	25	3,67	24,07
» »	1/4	12,5	2,01	13,16
» »	1/8	6,25	1,05	6,87
» »	1/10	5	0,72	4,71

B) Electrophorèse d'une solution d'albumine de Cohn.

La solution-mère dont nous partons est à 45 g. ‰, teneur voisine de celle du sérum normal.

Nous réalisons l'électrophorèse simultanée de dilutions décroissantes d'albumine obtenues à partir de la solution-mère et nous examinons l'intensité des taches après coloration. Les résultats sont réunis dans le tableau ci-dessous qui indique également

(1) ARDRY emploie pour les albumines et les globulines un coefficient de transformation identique : 6,25 (3).

les résultats obtenus avec un autre échantillon d'albumine. Pour ce dernier échantillon qui renferme une quantité importante de ClNa , le titre de chaque dilution a été vérifié selon la technique de GORNALL, BARDAWILL et DAVID (25).

	Prise d'essai	Dilut.	Albumine ‰ Dosage Markham	Quantité absolue d'Albumine	Intensité des taches
1)	0,007 ml.	S.M.	45	0,315 mg.	+++
2)	»	3/4	33,75	0,235	+++
3)	»	1/2	22,5	0,1575	++
4)	»	1/5	9	0,063	+
5)	»	1/10	4,5	0,0315	±
6)	0,003 ml.	S.M.	45	0,135 mg.	+++
7)	»	1/2	22,5	0,0675	++
8)	»	1/4	11,25	0,034	+
9)	»	1/8	5,63	0,017	

Dosage Gornall

10)	0,008 ml.	S.M.	29,5	0,236 mg.	+++
11)	»	4/5	24	0,192	+++
12)	»	2/3	20	0,160	++
13)	»	1/2	14,5	0,116	++
14)	»	1/4	7,25	0,058	+
15)	»	1/8	3,25	0,026	+

Ainsi, en faisant varier d'une part le taux des dilutions et d'autre part la quantité de solution déposée, on s'aperçoit que dans l'électrophorèse sur papier (coloration au noir amide 10 B), la quantité d'albumine à étudier pour obtenir une tache d'intensité minimum est voisine de 0,02 mg. Si la quantité de solution protéique déposée sur la piste de départ est de 0,008 ml. à 0,010 ml. (conditions habituelles), on ne peut retrouver l'albumine si celle-ci est à un taux inférieur à 2 g.-2,50 g. par litre.

Pour avoir une tache d'intensité correcte (++ à +++) il faut étudier 0,10 à 0,20 mg. d'albumine représentant une concentration initiale de 10 à 20 g. par litre (si l'on utilise 0,010 ml.) et de 12,50 à 25 g. (si l'on utilise 0,008 ml.).

Nous fixons ainsi l'ordre de grandeur de la quantité de liquide à déposer pour une concentration protéique approximativement connue (cas des urines, du L.C.R., etc.) qu'il faut préalablement concentrer (23), (52).

D'autre part, nous avons voulu vérifier s'il y avait proportionnalité entre le taux de l'albumine déposée et la surface des courbes obtenues :

		Quantité absolue d'Albumine	Unités planimétriques
1)	Décoloration	0,315 mg	376
2)	en cuves selon	0,235	363
3)	GRASSMAN et HANNIG	0,1575	179
4)	(28) (29)	0,063	85
10)	Décoloration	0,236	926
11)	au	0,192	541
12)	Kuma-Gawa	0,160	447
13)	selon	0,116	349
14)	DREVON	0,058	261
15)	(19)	0,026	130

Ces chiffres nous inspirent les remarques suivantes :

1) La décoloration au Kuma-Gawa donne des intensités plus fortes pour des quantités d'albumine égales. Il est donc possible que le procédé de décoloration en cuves par bains successifs réalise une certaine élution du colorant. Ceci renforce la valeur de la seconde technique, son auteur ayant montré que des extractions répétées au Kuma-Gawa ne modifient pas les proportions des constituants du mélange protéique.

Par ailleurs, le procédé de récupération par le charbon activé du mélange méthanol-acide acétique qui sert à la décoloration en cuves des bandes d'électrophorèse a été critiqué (64). Il est peut-être responsable d'une décoloration trop poussée et c'est pourquoi nous lui préférons le procédé DREVON qui assure une grande constance dans l'intensité des taches révélées et permet l'emploi d'une quantité réduite de mélange décolorant.

2) La relation entre la quantité d'albumine et les surfaces correspondantes n'est pas une relation linéaire. KUNKEL et TISELIUS (36) l'ont déjà montré en procédant différemment. Ces auteurs ont découpé la bande de papier en petits fragments et ont, soit élué le colorant après action du bleu de bromophénol, soit élué les protéines par de la soude et coloré selon FOLIN par une solution cupro-tartrique carbonatée. Aucune de ces deux méthodes ne fournit des résultats exactement en accord avec le taux d'azote des protéines.

KUNKEL et TISELIUS ont mesuré la densité optique en fonction de la concentration en protéines après avoir déposé

sur le papier des quantités variables de protéines et élué le colorant comme décrit. Les albumines ont alors montré une plus grande rétention du colorant que les γ -globulines ; cette rétention augmente avec la concentration.

En conclusion, si l'on colore les protéines par le noir amide 10 B, il faut, pour obtenir de bons diagrammes, partir d'une quantité absolue d'albumine supérieure à 0,20 mg., ce qui représente 0,008 ml. d'une solution à 25 g./L.

La relation entre la quantité d'albumine étudiée et l'intensité des taches obtenues évaluée par planimétrie n'est pas une relation linéaire et la lecture photométrique des bandes ne peut en aucun cas donner un renseignement sur le taux absolu de protéines mises en œuvre.

III. — INFLUENCE DE LA POSITION DES BANDES DANS LES CUVES

Nous nous sommes attaché dans un certain nombre d'expériences menées dans des conditions identiques à faire varier la position des bandes de papier les unes par rapport aux autres dans les cuves d'électrophorèse. Il nous est, en effet, apparu difficile, sinon impossible, d'obtenir des diagrammes rigoureusement semblables en opérant dans des conditions cependant identiques alors qu'il était, pour nous, de la plus haute importance de pouvoir comparer des échantillons inconnus avec des protéines déterminées dans un but d'identification.

On sait qu'au cours d'une opération d'électrophorèse sur papier, nombreux sont les phénomènes qui peuvent entraîner une modification dans le cheminement des protéines : irrégularités du papier, température, électro-osmose, etc....

Dans chaque cuve de l'appareil Elphor-H, les électrodes sont disposées non pas au centre du compartiment mais sur le côté (ce qui nous permet de définir la position d'une bande par « côté électrode » ou « côté opposé aux électrodes »). Théoriquement, ce montage ne doit pas avoir de répercussions sur l'une ou l'autre des deux bandes placées dans la cuve, ces bandes étant séparées du compartiment à électrodes par un couloir placé au centre de la séparation.

Nous avons donc effectué des électrophorèses en plaçant les bandes dans toutes les positions possibles :

1. Dans une même cuve : côté électrodes et côté opposé aux électrodes : expériences 65, 74, 87.

2. Dans des cuves différentes :

A) Côtés semblables par rapport aux électrodes :

a) Côté électrodes et côté électrodes : expériences 60, 86, 87.

b) Côté opposé aux électrodes et côté opposé aux électrodes : expériences 84, 85, 89, 93, 95.

B) Côtés différents par rapport aux électrodes : expériences 58, 60, 86, 87.

Les échantillons examinés sont identiques dans chaque série d'expériences : se sont des sérums, normaux ou pathologiques et des extraits de tissus.

Résultats.

De ces expériences, nous avons extrait le tableau I qui donne les elongations de différentes fractions en mm. par rapport à la ligne de départ.

Il est impossible de retrouver d'une manière constante des elongations identiques pour les différentes fractions protéiques d'un même échantillon.

L'expérience 87 effectuée dans une même cuve montre une similitude remarquable des elongations, mais il n'en est pas de même de l'expérience 74 ! Si deux des bandes de l'expérience 86 (côté électrodes) accusent des différences acceptables, il n'en est pas de même de la troisième étudiée cependant dans des conditions rigoureusement identiques.

Conclusions.

Ainsi, *une même expérience* ne donne pas des déplacements identiques des fractions étudiées selon que l'on opère dans une même cuve ou dans des cuves différentes. Ceci rend très délicat le problème de l'identification des protéines en opérant simultanément avec un témoin. Nous y reviendrons plus loin.

Quels sont les facteurs qu'il faut invoquer pour expliquer ces variations ? Le problème est délicat puisque les expériences ont été menées simultanément dans des conditions identiques. La nature du tampon ? Les variations se reproduisent aussi bien avec le tampon phosphaté qu'avec le tampon véronal-acétate. La température ? Nous verrons qu'elle varie peu à l'intérieur de la cuve. L'homogénéité du papier ? Elle peut être mise en avant car nous allons montrer dans le chapitre suivant que le papier filtre est une cause d'erreur au cours de la lecture photométrique. Son hétéro-

TABLEAU I

*Influence de la position des bandes dans les cuves d'électrophorèse sur les elongations
(exprimées en millimètres depuis la ligne de départ) des différentes fractions protéiques.*

1°) ELECTROPHORÈSES CONDUITES SIMULTANÉMENT
DANS UNE SEULE CUVE

					Elongations
Sérum humain n° 87	Bande n° 1	64	96	114	136
tampon pH 7,15	Bande n° 2	64	96	114	136
Sérum humain n° 74	Bande n° 1	74	108	126	146
tampon pH 8,6	Bande n° 2	94	126	148	170
					198

2°) ELECTROPHORÈSES CONDUITES SIMULTANÉMENT
DANS PLUSIEURS CUVES

A) Bandes placées du côté des Electrodes.

Sérum humain n° 86	Bande de la cuve n° 1	94	118	132	155
tampon pH 7,15	Bande de la cuve n° 2	90	116	130	150
	Bande de la cuve n° 3	64	96	114	136
Tissu parotidien sain n° 60	Bande de la cuve n° 1	36	60	90	118
tampon pH 7,15	Bande de la cuve n° 2	40	74	106	140
					162
					170

B) Bandes placées du côté opposé aux Electrodes.

Sérum humain n° 95	Bande de la cuve n° 1	68	90	8	124
tampon pH 7,15	Bande de la cuve n° 2	76	100	110	134
Sérum humain n° 84	Bande de la cuve n° 1	96	130	146	170
tampon pH 7,15	Bande de la cuve n° 2	94	134	154	176
	Bande de la cuve n° 3	76	104	118	144

généité est indiscutable. Dès lors, n'expliquerait-elle pas certaines perturbations dans le cheminement des protéines : variations du flux électro-osmotique, intensités différentes du courant d'électrolyse d'une bande à l'autre entraînant également une variation de chaleur dégagée par effet Joule, certes minime, mais suffisante pour contrarier la migration des fractions ?

IV. — COLORATION ET PHOTOMÉTRIE

Dans cet exposé, nous allons étudier certains points se rapportant à la technique d'évaluation quantitative du pourcentage des fractions séparées par électrophorèse sur papier. Cette technique comprend deux phases : la coloration et la lecture photométrique.

Nous examinerons successivement :

1. L'homogénéité du papier-filtre.
2. Le choix du colorant.
3. Les procédés de lecture photométrique.

Homogénéité du papier-filtre.

MERKLEN et MASSEYEFF (43) ont constaté que l'adsorption d'albumine par le papier produisait une trainée sur la bande et abaissait la teneur des albumines en augmentant celles des globulines. Cette adsorption serait d'autant plus grande que le papier serait plus épais. Le choix du papier est donc important, et doit être guidé également par ce que nous appellerons « l'homogénéité du papier à la lecture photométrique ».

En effet, lorsque l'on examine le relevé photométrique d'une bande d'électrophorèse après coloration, on est frappé par certaines irrégularités du diagramme qu'il convient de corriger pour obtenir un tracé régulier. Nous avons essayé de préciser l'ordre de grandeur des variations dues aux inégalités du papier.

EXPÉRIENCES GROUPÉES SOUS LE N° 75.

a) Une bande de papier *Whatman* n° 1 blanche est rendue transparente à l'aide du liquide Transparenzol.

b) Une deuxième bande vierge, non soumise à l'électrophorèse, est colorée et décolorée dans les conditions habituelles. Elle est de même rendue transparente.

Chacune de ces bandes est passée au photomètre de lecture.

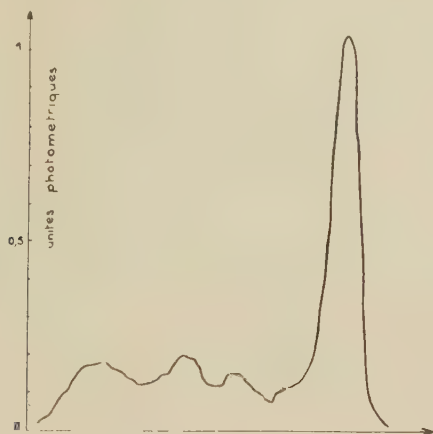


FIG. 1. — *Sérum normal.*

Diagramme obtenu par la réunion exacte de tous les points déterminés par photométrie (papier Whatman n° 1, coloration noir amide 10 B).

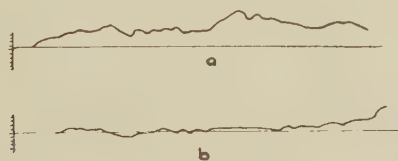


FIG. 2. — a) *Tracé obtenu par lecture photométrique d'une bande d'électrophorèse vierge rendue transparente (papier Whatman n° 1).* — b) *Tracé obtenu par lecture photométrique d'une bande d'électrophorèse colorée et décolorée dans les conditions habituelles (papier Whatman n° 1, coloration noir amide 10 B).*

La figure 1 montre un tracé de sérum normal tel qu'il est obtenu par la réunion exacte de tous les points déterminés par photométrie et la figure 2 les tracés obtenus avec la bande blanche et la bande colorée et décolorée.

On voit ainsi l'ordre de grandeur des variations du tracé imputables à l'inégalité du papier. On constate que ces irrégularités ne sont pas dues à une adsorption du colorant par le fond du papier-filtre puisque la bande colorée-déco-

lorée ne montre pas de variations plus grandes que la bande vierge.

Les écarts constatés sont de l'ordre de 0,02 à 0,03 unités photométriques. Ils peuvent cependant atteindre exceptionnellement 0,06 à 0,09 unités. On réalise leur importance relative en pensant que le pic des albumines correspond généralement à 1 unité, et celui des γ globulines à 0,2-0,3 unités.

Dès lors, il est important de repérer visuellement les fractions sur la bande colorée et sur le diagramme pour ne pas risquer de créer des sous-fractions illusoires. La mesure directe des elongations des fractions visibles sur la bande et leur report sur le diagramme constitue un procédé sûr de repérage exact.

Choix du colorant.

Nous avons utilisé la coloration au noir amide 10 B parce que ce colorant donne les résultats le mieux en accord avec ceux de l'électrophorèse selon TISELIUS. On comprend facilement l'intérêt qu'il y a à l'utiliser pour un travail de recherches. Cependant, de nombreux auteurs (21), (14), (53) se servent du bleu de bromophénol dont l'emploi est plus simple, mais il exige l'intervention d'un facteur de correction (multiplication du pourcentage d'albumines sériques par 2,35 si l'on prend la somme des chiffres trouvés pour chacune des globulines égale à l'unité). Ce facteur de correction peut être soumis à de nombreuses critiques si l'on songe que l'adsorption du colorant peut ne pas être la même entre deux fractions globuliniques ou seulement entre deux globulines provenant l'une d'un sérum normal et l'autre d'un sérum pathologique (27). Ce facteur est réduit à 1,15 dans la coloration au noir amide 10 B : il affecte les globulines si l'on prend le pourcentage d'albumines égal à l'unité. BENHAMOU et POLONOVSKI (8) estiment que, dans la coloration au noir amide 10 B, seules les globulines nécessitent un coefficient de correction de 1,25 (!). Pour notre part, nous avons renoncé à appliquer un coefficient de correction, quel qu'il soit.

D'autre part, la coloration au bleu de bromophénol exige une quantité de protéines plus importante que celle au noir amide 10 B (20 mm³ au lieu de 8 à 10 pour le cas d'un sérum), ce qui n'est peut-être pas un inconvénient dans l'analyse d'un sérum, mais constitue une gêne lorsque l'on dispose d'une solution protéique en faible quantité ou peu concentrée (cas des protéines tissulaires).

La technique de coloration au bleu de bromophénol que nous avons essayée et qui donne de bons résultats est la suivante (21) :

- a) immerger pendant 10 minutes la bande séchée dans une solution à 1 % de bleu de bromophénol dans l'alcool absolu saturé de chlorure mercurique,
- b) laver 10 minutes à l'eau courante,
- c) sécher.

C'est un procédé pratique et rapide qu'il est très intéressant d'utiliser en clinique pour l'examen des sérums. Il présente l'inconvénient que nous signalons plus haut d'introduire un coefficient de transformation arbitraire, et pour un travail de recherche, nous lui préférons la coloration au noir amide 10 B, plus longue et plus délicate, avec expression directe du pourcentage des surfaces déterminées par planimétrie.

Procédés de lecture photométrique.

Nous avons eu l'attention attirée sur ce point par les différences des modes opératoires préconisés par les constructeurs de deux appareils d'utilisation courante en France : Jouan et Elphor H.

Si JOUAN utilise une simple photométrie à sec de la bande placée entre deux plaques de verre, par contre ELPHOR rend cette bande transparente par un mélange d'huile de paraffine et d' α -bromo-naphtalène (technique de GRASSMAN et HANNIG).

La source lumineuse trop faible du photomètre Elphor ne permet pas une évaluation à sec des bandes d'électrophorèse.

La photométrie comparée d'une même bande, rendue transparente par le mélange Transparenzol, avec les deux types de photomètre nous conduit à des résultats quasi identiques tant au point de vue proportions que forme de la courbe.

Mais si l'on compare, avec le photomètre de JOUAN, la même bande à sec et après l'avoir rendue transparente, on aboutit à des différences notables :

- a) dans la forme de la courbe qui montre des sommets plus nets dans le cas d'une photométrie à sec,
- b) dans les proportions des différentes fractions. Les albumines sont augmentées nettement par rapport aux fractions globuliniques si l'on rend la bande transparente. Voici un exemple de résultats obtenus :

Bande n° 1 (colorat. noir amide) :

	γ	β	α_2	α_1	<i>Alb.</i>
a) à sec	29,2	12,7	8,6	5,9	43,6
b) après transparence	28,2	10,8	7	4,1	49,9

Bande n° 2 (colorat. Bl. Bromoph.) :

	γ	β	α_2	α_1	<i>Alb.</i>
a) à sec	33,9	17,9	15,6	7,8	24,8
b) après transparence	35,1	7,3	11,1	6,4	40,1

Les différences importantes ainsi constatées nous permettent de dire qu'il est impossible de comparer des résultats d'électrophorèse sur papier qui n'ont pas été obtenus dans des conditions rigoureusement identiques. C'est ce que nous précisons plus loin en réalisant des séries d'électrophorèses qui constituent une sorte d'étalonnage des conditions opératoires.

La détermination du pourcentage des fractions par évaluation photométrique de l'intensité des taches se heurte encore à une autre critique. On lui reproche de ne pas donner sur le diagramme une reproduction fidèle des taches obtenues sur la bande. En effet, chaque tache n'a généralement pas la même intensité de coloration au centre du papier et sur les bords où se produisent divers phénomènes qui provoquent un ralentissement de la migration par rapport à la zone centrale qui constitue alors un « front » de migration. Ces phénomènes de bord peuvent être facilement évités si l'on se sert d'une bande de papier-filtre assez large permettant de déposer la goutte de solution protéique bien au centre de la piste de départ (sur un front de 1 cm. pour une bande de 4 cm. de largeur). Le photomètre Elphor II, qui balaie toute la largeur de la bande, évalue alors la totalité de chaque tache et la critique d'une évaluation partielle de l'intensité tombe. Par contre, il n'en est pas de même avec certains photomètres qui ne permettent de lire qu'une zone centrale très réduite de la bande.

D'autres critiques surgissent à l'occasion de la construction des courbes de Gauss et de la planimétrie. Nous y reviendrons plus loin.

Conclusion.

Il ressort des constatations ci-dessus que l'on est en droit d'attendre de bons résultats, très constants, de la photométrie des bandes après coloration à condition de suivre une technique fidèle et bien établie. La comparaison des résultats obtenus par des techniques différentes s'avère impossible.

CHAPITRE II

Etude des « positions » et « mobilités »

Interprétation quantitative des électrophorèses sur papier

POSITIONS ET MOBILITÉS

Une fois obtenue la bande colorée, se pose le problème qualitatif du *repérage des fractions*.

Ce problème est d'ailleurs identiquement le même qu'il s'agisse des clichés photographiques fournis par l'électrophorèse classique (procédés de LONGSWORTH, SVENSSON, PHILPOT, etc.) ou des diagrammes obtenus par photométrie des bandes colorées fournies par l'électrophorèse sur papier.

Le problème primordial que pose l'étude des mélanges de protéines autres que celles du sérum (telles que les protéines tissulaires, végétales, etc.) consiste dans la reconnaissance *sans ambiguïté* des fractions séparées par l'électrophorèse et auxquelles le biochimiste accorde une individualité indéniable.

La solution de ce problème est donnée classiquement par la détermination des « mobilités » électrophorétiques puisque les fractions séparées — et définies par cette séparation — le sont précisément du fait de leurs vitesses de migration différentes, autrement dit de leurs mobilités. Il convient ici de rappeler quelques définitions fondamentales :

Dans l'électrophorèse classique en tube en U (électrophorèse libre), la mobilité μ d'une particule protéique est représentée par le quotient de la vitesse de migration par l'intensité du champ. Des considérations théoriques déve-

TABLEAU II
Valeurs des « mobilités » électrophorétiques des différentes fractions protéiques du plasma humain.

FRACTIONS PROTÉIQUES	ALBUMINE	GLOBULINES								
		α_0	α_1	α_2	β_1	β_2	Fibr.	γ_1	γ_2	γ_3
<i>Auteurs :</i>										
TISELIUS (1)	5,1		3,8			2,7		1,9		
ARDRY (2)	5,1 ± 0,05	4,5 ± 0,1	4,15 ± 0,15	3,7 ± 0,15	3,1 ± 0,15	2,35 ± 0,15			1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2
ARDRY (3)	5,0 à 5,15	4,0 à 4,3	3,5 à 3,8	2,9 à 3,25	2,2 à 2,7		2,0 à 2,2	1,3 à 1,7	0,9 à 1,1	
BISERTE et MASSE (4)	5,95	5,07	4,05			2,83	2,15		1,10	
BOCK (5)	6,2 à 6,6	5,2 à 5,5	3,75 à 4,25	2,92 à 3,40			2,06 à 2,50		1,35 à 1,63	

- (1) TISELIUS (A.), *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1464.
 (2) ARDRY (R.), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, n° 3-4, 236-241.
 (3) ARDRY (R.), *Ann. Biol. Clin.*, 1952, **10**, 575-627.
 (4) BISERTE (G.) et MASSE (L.), *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 671.
 (5) BOCK (J.), *Gérontol.*, 1948, **3**, 119.

loppées par TISELIUS et sur lesquelles nous ne pouvons insister permettent d'écrire les égalités :

$$\mu = \frac{V_0}{E} = \frac{q}{6\pi nr} = \frac{S\mu}{It}$$

dans lesquelles V_0 est la vitesse de migration, E l'intensité du champ électrique, q la charge électrique de la particule, n le coefficient de viscosité du milieu, r le rayon de la particule supposée sphérique, S la surface de la section transversale de la solution soumise à l'électrophorèse, l la dis-

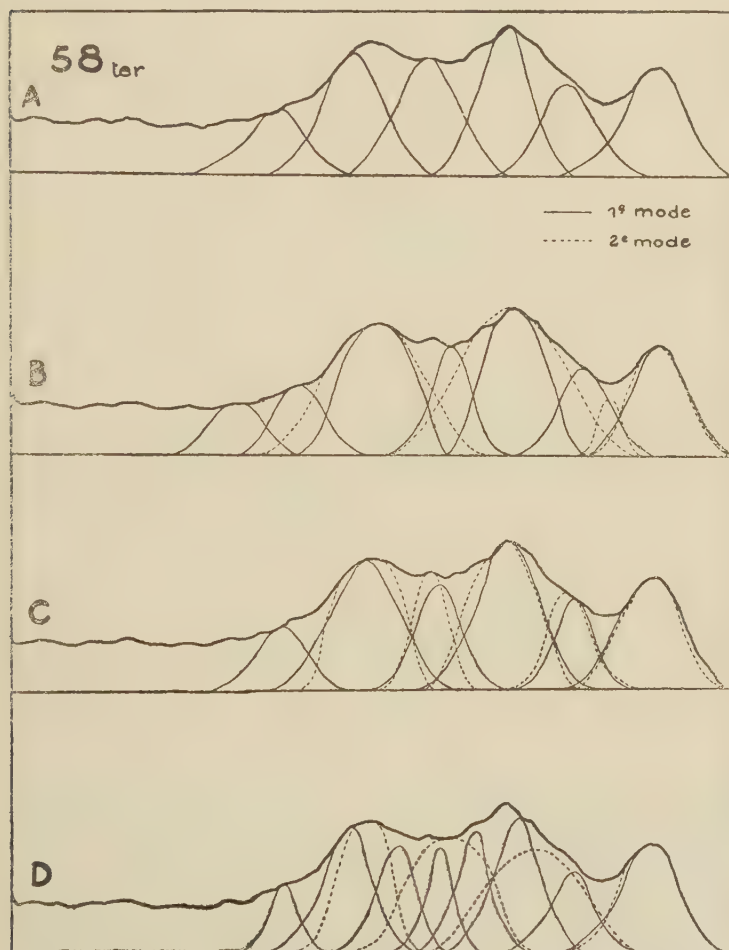


FIG. 3.

lance parcourue par la particule pendant le temps t , I l'intensité du courant et K la conductibilité spécifique de la solution. La notion de conductibilité spécifique introduit elle-même trois paramètres : la température, la force ionique et le pH du mélange tampon utilisé comme solvant des protéines. La détermination de la conductibilité spécifique

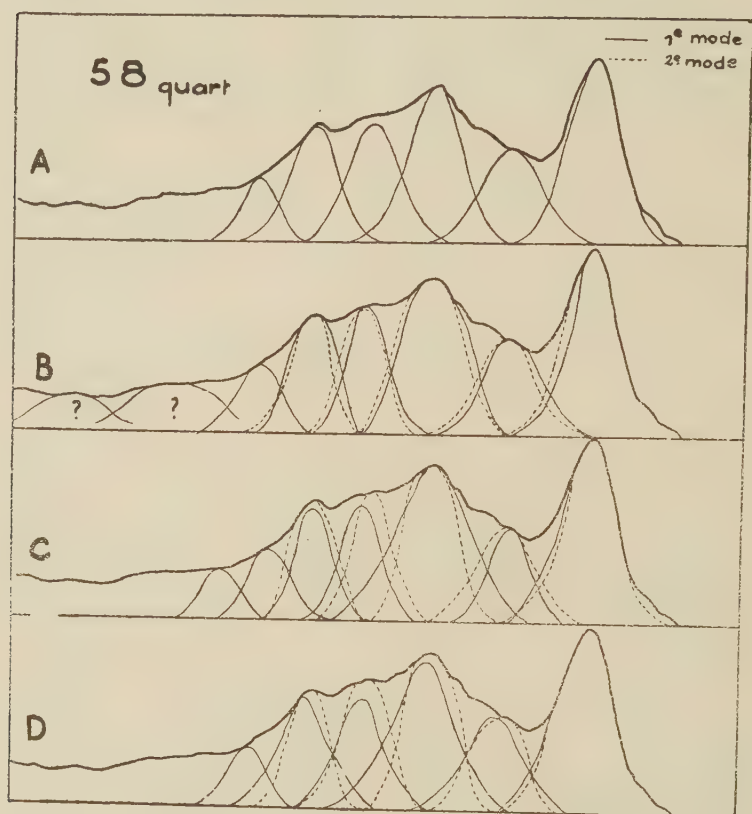


FIG. 4.

suppose évidemment une opération indépendante et un appareillage classique mais coûteux. Quant à l'expression de la mobilité, elle implique que l'on fixe et indique les valeurs des trois paramètres et la surface de la section du tube en U [cf. GRABAR (26)].

Malgré ces précisions, on constate, d'un auteur à l'autre — même si l'on tient compte des pH légèrement différents auxquels ont été faites les mesures — des variations notables de la valeur des mobilités comme en témoignent les chiffres du tableau II.

Devant ces imprécisions inhérentes à la complexité biologique, nous nous sommes demandé si une méthode graphique d'application simple ne permettrait pas, au même titre que la détermination très délicate des mobilités, et sans qu'il soit nécessaire d'effectuer d'autres mesures, de résoudre le problème.

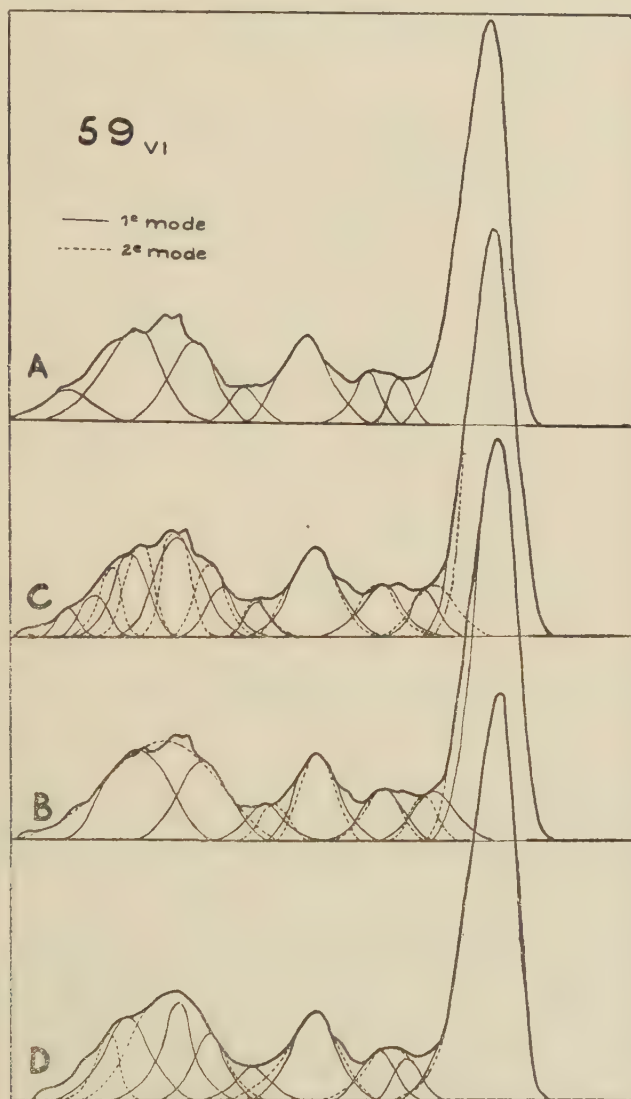


FIG. 5.

Nous nous sommes engagé dans cette voie après avoir constaté que l'interprétation de nos propres diagrammes par différentes personnes, si elle laissait place à discussion quant au taux des différentes fractions, donnait des réponses très voisines quant aux « positions » de ces mêmes fractions sur le papier.

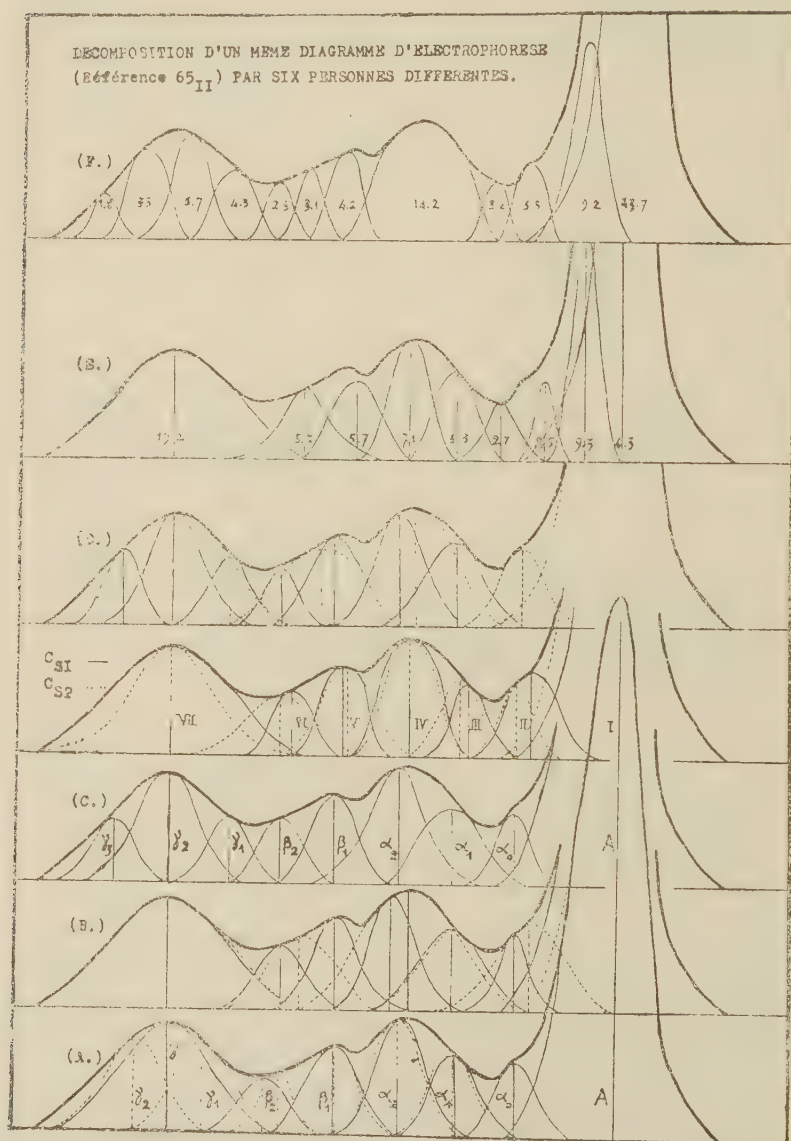


FIG. 6.

Nous mettons sous les yeux du lecteur l'interprétation par des personnes différentes de quatre diagrammes pris au hasard se rapportant à des extraits tissulaires (fig. 3-4) et à des sérums (fig. 5-6).

Cette expérience, que nous ne sommes certainement pas les seuls à avoir tentée, avait pour but de dégager la part de subjectivité qui intervient dans la décomposition du dia-

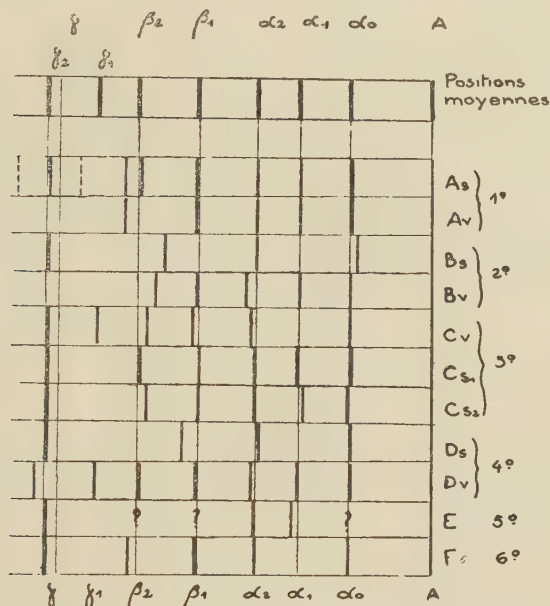


FIG. 7.

*Positions relatives des différentes fractions d'un même sérum.
Interprétations du même diagramme par six personnes différentes.*

gramme en courbes de GAUSS. Or, cette décomposition est nécessaire pour le calcul ultérieur — planimétrique — du taux des différentes fractions. Au simple examen de ces figures, on constate que deux tendances se manifestent :

a) Celle de simplifier à l'extrême et de ne retenir que les fractions « évidentes », bien marquées par les maximum de la courbe [c'est ce que faisait déjà TISELIUS qui n'a jamais décrit que les albumines, les α , les β et les γ -globulines (fig. 6, diagramme 65 II, B)].

b) Celle de décomposer le diagramme en une multitude de courbes de GAUSS, ce qui accroît le nombre des fractions et conduit à dissocier arbitrairement les α , β et γ -globulines en sous-fractions sans réalité physico-chimique (fig. 6, E, F).

On constate l'influence importante du facteur personnel lorsqu'il s'agit de décomposer un diagramme d'électrophorèse en courbes de GAUSS. Ce problème se complique par la suite quand il faut identifier les fractions protéiques. Cependant, comme nous l'avons dit plus haut, l'interprétation d'un même diagramme par différentes personnes donne aux différentes fractions des « positions » très voisines.

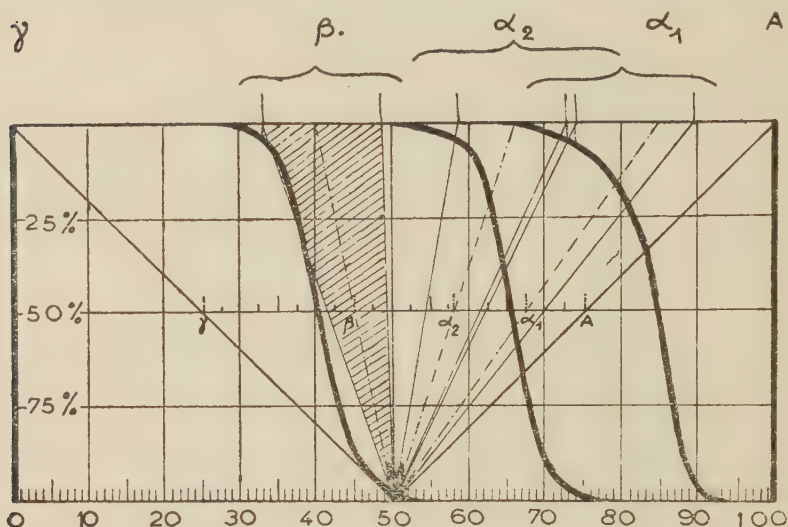


FIG. 8.

*Diagramme des fréquences groupées
relatif à la position (élongation) des globulines
au cours de l'électrophorèse à pH 9.1 selon ANTWEILER.*

Abscisses : Position des différentes fractions.

Ordonnées : Pourcentage des cas dans lesquels on observe une élongation inférieure ou égale à une valeur donnée, portée en abscisses.

L'espace qui sépare la position de la γ globuline et celle de l'albumine a été divisé arbitrairement en 100 parties égales.

Les traits pleins et mixtes partant du point M font comprendre comment ont été construites les abaqes relatives aux différentes sortes d'électrophorèse : traits pleins = fréquence 5 % ; traits mixtes = médiane (fréquence 50 %).

N. B. — Si nous avons choisi comme terme de référence l'espace γ —A c'est :

1°) Qu'il n'y a, en général, aucun doute sur l'existence et la position de ces deux fractions extrêmes, l'une (γ globuline) à migration très lente, l'autre (albumine) à migration rapide.

Partant des onze interprétations de la fig. 6, nous extrayons le graphique de la fig. 7 qui représente les positions des différentes fractions rapportées à l'espace γ -A.

Dès lors, notre méthode de travail se conçoit aisément. Elle a consisté à effectuer des mesures aussi précises que possible (sur agrandissements photographiques) des diagrammes d'électrophorèse reproduits dans de très nombreux mémoires. Nous en avons de la sorte réuni plusieurs centaines. L'emploi des diagrammes des fréquences groupées nous a permis d'établir à partir de ces relevés les variations normales des positions des différentes fractions protéiques des sérums humains.

A titre d'exemple, nous présentons, dans la fig. 8, le diagramme relatif aux 67 électrophorèses reproduites dans l'ouvrage d'ANTWEILER et obtenues avec le tampon de MICHAELIS pH = 9,1. Les droites en trait plein, pointillé ou mixte de la fig. 8 font également comprendre comment ont été obtenues les abaques A, B, C de la fig. 9, abaques qui sont relatives :

A) A l'électrophorèse selon ANTWEILER, tampon MICHAELIS pH 9,1.

B) A l'électrophorèse selon TISELIUS, en tampon véronal sodique de pH = 7,9-8,2, force ionique 0,1, d'après les résultats de KOÏW et collaborateurs (35).

C) A l'électrophorèse sur papier (en tampon véronal sodique également) d'après le travail de KOÏW, lequel avait précisément pour objet de comparer l'électrophorèse sur papier et l'électrophorèse en tube en U sur les mêmes échantillons de sérum.

Passage aux mobilités.

On conçoit maintenant que si l'on construit de même, à partir des chiffres des « mobilités » publiés par différents auteurs et reproduits partiellement au tableau II ci-dessus des diagrammes ou abaques dans lesquels les mobilités sont données en abscisses dans l'espace γ -A, il devient possible de déterminer par lecture directe, avec une précision très suffisante dans la pratique, la mobilité des différentes fractions protéiques qui apparaissent sur un diagramme d'électrophorèse quelconque. Nous donnons en D, sur la fig. 9, l'échelle que nous avons utilisée pour tenter de transformer en « mobilités » les « positions » déterminées par ailleurs.

Le diagramme d'électrophorèse que nous avons fait figurer sur les abaques C et D montre de plus — sans qu'il

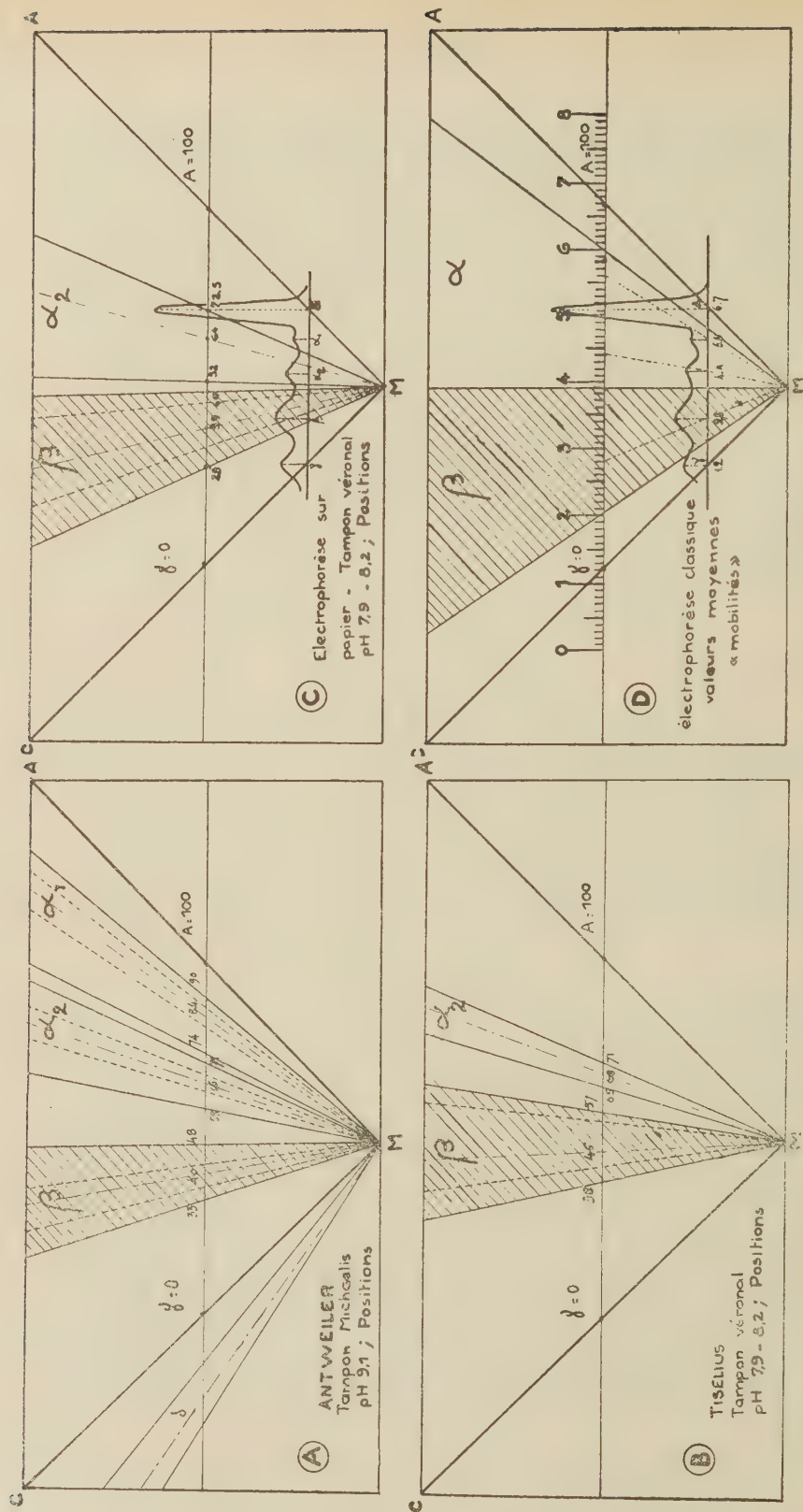


Fig. 9. — Positions relatives des fractions α_1 , α_2 , β , respectivement dans l'électrophorèse selon ANTWEILER Tampon Michaelis pH 9,1 (fig. 9, A) — TISELIUS Tampon véronal pH 7,9-8,2 (fig. 9, B) et dans l'électrophorèse sur papier tampon véronal pH 7,9-8,2 (fig. 9, C). — Fig. 9, D : « mobilités » des fractions α_1 , α_2 , β (chiffres moyens d'après le tableau II. — La partie hachurée de gauche correspond à la zone des β globulines, les fuseaux de droite aux α_1 ou α_2 globulines.

Trait plein — : fréquence 5 % ; Trait pointillé — — — : fréquence 25 % ; Trait mixte — · — · : médiane (fréquence 50 %).

soit besoin de donner plus amples explications — comment on peut repérer, d'après la position des perpendiculaires

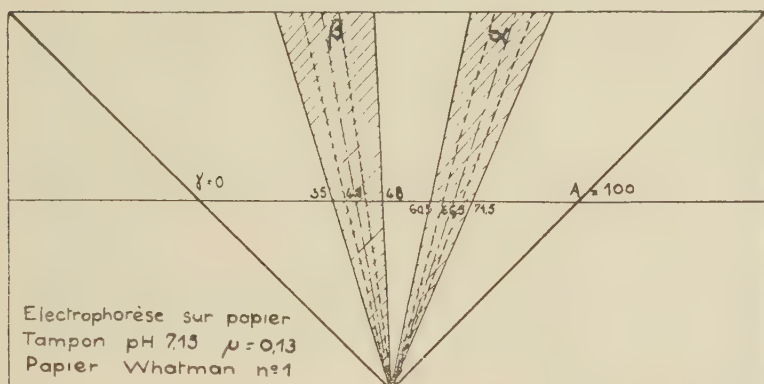


FIG. 10. — Positions relatives des fractions α et β globul. dans l'électrophorèse sur papier. Appareil Elphor H, tampon phosphate pH = 7,15.

Trait plein — : fréquence 5 % ; Trait pointillé — — — : fréquence 25 % ; Trait mixte — — — — : médiane (fréquence 50 %).

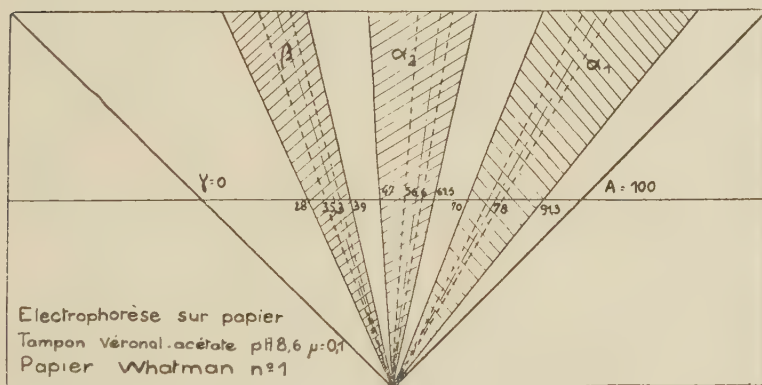


FIG. 11. — Positions relatives des fractions α_1 , α_2 et β globul. dans l'électrophorèse sur papier. Appareil Elphor H, tampon véronal-acétate pH = 8,6.

Trait plein — : fréquence 5 % ; Trait pointillé — — — : fréquence 25 % ; Trait mixte — — — — : médiane (fréquence 50 %).

abaissées des sommets des « pics » successifs, soit les positions relatives des différentes fractions (fig. 9 C), soit les mobilités correspondantes (fig. 9 D) ; il suffit d'amener γ et A, pieds des perpendiculaires correspondant à la γ globu-

line et à l'albumine, sur les demi-droites MC, MA, de telle sorte que A reste parallèle à CA. L'interprétation est d'autant plus facile que le diagramme est à plus grande échelle.

Par la suite, nous avons réalisé une sorte d'étalonnage des mobilités dans nos conditions opératoires en construisant des abaques à partir de séries de sérums normaux dont nous donnons par ailleurs les chiffres (résultats du tableau IV).

Pour la commodité des comparaisons et de l'expression chiffrée des résultats de l'électrophorèse, nous préférons toutefois ramener par le calcul toutes les elongations mesurées à ce qu'elles seraient pour l'espace $\gamma - A = 100$. Ceci revient, on le voit, à exprimer les elongations *en pourcentages* comme cela se fait dans l'expression des proportions relatives des différentes protéines par rapport aux protéines totales.

Exemple d'application.

Diagramme (A) de la fig. 6 (tampon véronal-acétate).

L'abaque-type (fig. 11) permet de reconnaître les 3 fractions séparées en tampon véronal-acétate en dehors des albumines et des γ globulines, à savoir : α_1 , α_2 et β globulines.

La fraction appelée α_0 sur le diagramme (et que certains auteurs reconnaissent) appartient en réalité aux α_1 globulines. Les α_1 et α_2 globulines du diagramme se trouvent dans la zone des α_2 globulines et la décomposition en deux fractions est une nécessité de construction. Il en est de même pour les courbes β_1 et β_2 qui représentent les β globulines.

Nous pensons toutefois qu'il n'est nullement besoin d'exprimer en « mobilités » TISELIUS les « positions » déterminées par électrophorèse sur papier (1).

Bien plus, dans un protéinogramme tel que celui de la fig. 3 (diagramme 58 ter) qui correspond à une électrophorèse sur papier de protéines tissulaires, il ne nous semble pas non plus indispensable de « baptiser » les différentes fractions. Il suffit, croyons-nous, de les désigner par leurs elongations dans l'espace γ -A arbitrairement égalé à 100. On pourrait se contenter de calculer les taux des protéines dans les différentes sections ou tranches verticales (0 à 10, 10 à 20, ... 90 à 100) par planimétrie des surfaces déterminées. Ce mode d'expression aurait l'avantage de permettre

(1) D'autres auteurs, dont ARDRY R. (6) ont indiqué le moyen de passer des mobilités *Tiselius* aux mobilités en électrophorèse sur papier. Cet auteur propose un procédé de repérage des fractions protéiques en se référant à la position de l'albumine.

instantanément la comparaison des protéinogrammes électrophorétiques et des courbes de relargage. En résumé :

1. Nous proposons d'interpréter les diagrammes d'électrophorèse en se référant à l'espace γ -A, espace séparant la γ globuline de l'albumine, généralement facile à repérer.

2. La méthode statistique (diagrammes des fréquences groupées) permet de fixer les positions médianes et extrêmes des fractions électrophorétiques nettement individualisées dans les sérums, telles que les α_1 et α_2 globulines et la β globuline.

3. Un graphique établi sur papier calque et représentant les « positions » des différentes fractions dans l'espace γ -A est appliqué sur le diagramme d'électrophorèse à interpréter et permet de connaître, sans aucune ambiguïté, d'après la position des différents pics, à quelle fraction il faut rapporter les protéines auxquelles ces pics correspondent.

4. L'extension de ce procédé graphique permet au besoin d'exprimer en « mobilités » les « positions » de chaque fraction.

5. L'expression des résultats quantitatifs d'une électrophorèse gagnerait en objectivité dans certains cas (protéines tissulaires ou protéines de nature inconnue) si les taux des différentes protéines constituant le mélange, au lieu d'être rapportés à des fractions globuliniques α_1 , α_2 , β , etc... étaient simplement déterminés par planimétrie après division en parties égales (décimales) de l'espace qui sépare la protéine ayant la vitesse de migration minimum et celle ayant la vitesse de migration maximum. Ce procédé rendrait facile la comparaison des diagrammes d'électrophorèse et des diagrammes de relargage.

Nous venons d'étudier une méthode originale d'identification des protéines qui nous a rendu les plus grands services. Nous n'avons pas voulu cependant négliger deux autres procédés de repérage qui a priori peuvent paraître plus simples. Nous envisagerons donc :

1) l'identification des protéines à l'aide d'une bande-témoin,

2) le repérage du point neutre par une solution de Dextran.

IDENTIFICATION DES PROTÉINES A L'AIDE DE BANDES-TÉMOIN

Nous avons déjà signalé plus haut les différences très importantes de la migration rapportée à la ligne de départ, et cela dans des conditions opératoires cependant identiques.

Nous avons recherché s'il y avait moyen de reconnaître sans difficulté des protéines inconnues en faisant migrer simultanément des protéines dont les fractions étaient préalablement identifiées.

Mode opératoire.

On remplace le support classique par un support construit spécialement ne comportant pas de séparation médiane. On peut alors disposer entre les deux bandes larges portant la solution à étudier une bande-témoin plus étroite (bande classique de largeur 38 mm. coupée par moitié dans le sens de la longueur, chargée soit avec un sérum normal, soit avec une solution d'albumine pure, ou la fraction II-III W de Cohn (γ globuline + prothrombine), ou un mélange albumine-fraction II-III-W (électrophorèse en tampon phosphate).

Comme il fallait s'y attendre, les fractions de même nature ne se retrouvent pas en des positions rigoureusement identiques par rapport à la ligne de départ. Ceci n'est pas d'ailleurs surprenant dans le cas où l'on compare une fraction isolée, migrant seule, avec un sérum, dans lequel les fractions interfèrent.

Cependant, si l'on exprime ces « positions » en « mobilités relatives » par rapport à l'espace γ -A, on obtient des chiffres qui restent sensiblement dans les limites de variation des positions calculées statistiquement.

Il est donc possible, pour identifier des protéines de nature inconnue (protéines tissulaires par exemple) de coupler ces deux procédés :

- a) faire une bande-témoin avec un sérum où l'on calcule les « mobilités relatives » de chaque fraction ;
- b) comparer avec l'abaque de l'espace γ -A obtenue statistiquement.

C'est ce que nous avons fait dans le cas des protéines des tissus sains et des tissus cancéreux (voir 2^e partie).

TABLEAU III

*Electrophorèses de sérum, de solution d'albumine pure et de solution de fraction II-III-W de Cohn.
Sur une même ligne horizontale, sont indiquées les elongations de 3 électrophorèses conduites simultanément dans
une même cuve. La bande-témoin est une bande classique coupée par moitié dans le sens de la longueur.*

TÉMOIN			FRACTIONS ÉTUDIÉES		
N ^{os}	Nature	Elongations	N ^{os}	Nature	Elongations
107-T1	Sérum n° 530.623	96 γ 134 β 150 α 180 A	107-I	Solution d'Albumine pure	184 A
107-T2	»	108 γ 150 β 166 α 192 A	107-III	Solution d'Albumine + fraction II-III-W	174 A
111-T	»	94 γ 120 β 134 α 158 A	111-I	»	80 γ 114 Fibr. 144 A
107-T3	»	86 γ 0 116 β 40,5 134 α 65 160 A 100	107-V	Sérum n° 530.623	84 γ 0 126 β 47,5 142 α 66 172 A 100
109-T	»	76 γ 0 102 β 43 114 α 63,5 136 A 100	109-I	»	70 γ 0 92 β 39,5 102 α 57 126 A 100
			107-II	Fraction II-III-W de Cohn	74 γ 0 106 β 41 120 α 59 152 A 100
			107-IV	Solution d'Albumine + fraction II-III-W	62 γ 0 86 β 39 98 γ 58 124 A 100
			111-II	»	90 γ 124 Fibr. 162 A
			107-VI	Sérum n° 530.623 + fraction II-III-W	74 γ 0 106 β 41 120 α 59 152 A 100
			109-II	Sérum n° 530.623	62 γ 0 86 β 39 98 γ 58 124 A 100

EMPLOI DU DEXTRAN

KUNKEL et TISELIUS (36) ont étudié le phénomène osmotique qui, à lui seul, peut provoquer le déplacement des protéines sur la bande de papier-filtre et se superposer à la migration sous l'influence du courant électrique. Ils utilisent à cet effet le Dextran, substance électriquement neutre. MACHEBOEUF (39 et 41), dans son étude sur l'électrorhéophorèse, en a fait également usage.

Nous avons ajouté systématiquement du Dextran à la solution protéique étudiée pour pouvoir juger de l'importance du flux osmotique que nous pensions être à l'origine des différences d'élongations constatées au cours d'expériences menées dans des conditions rigoureusement identiques. Nous avons dû y renoncer car la présence de Dextran altère le diagramme en provoquant la formation d'une traînée de colorant dans la zone des γ globulines et en arrière de celles-ci. Son emploi ne peut donc revêtir qu'un intérêt théorique. Nous indiquerons cependant brièvement son mode d'utilisation.

Réactif : Dextran Clin, à employer en solution aqueuse.

KUNKEL et TISELIUS emploient 0,005 ml. d'une solution à 3 %. Dans ces conditions, nous n'avons pas retrouvé la présence de Dextran après électrophorèse (coloration au bleu de bromophénol et au noir amide 10 B) ; les résultats ne sont pas meilleurs avec 0,005 ml. d'une solution à 10 %.

Il a fallu employer 0,020 ml. d'une solution à 20 % pour obtenir des taches nettes (blanches entourées d'un fond bleu). Mais alors, le diagramme est perturbé et on ne peut procéder qu'à un simple repérage qualitatif des fractions.

CHAPITRE III

Etude de la valeur de la planimétrie

L'appréciation des proportions relatives des divers constituants du mélange soulève le problème de la décomposition en courbes de Gauss et de la valeur de la planimétrie. Nous nous sommes efforcé de résoudre plusieurs questions :

1) La somme des surfaces des courbes de Gauss est-elle identique à la surface totale du diagramme ?

2) La marge des erreurs commises entre plusieurs planimétries d'un même diagramme et par des opérateurs différents est-elle importante ?

3) Lorsque la construction oblige à décomposer une fraction apparemment homogène en deux ou plusieurs courbes de Gauss, les résultats sont-ils identiques à ceux que l'on obtiendrait en ne construisant qu'une seule courbe ?

1. Rapport de la somme des surfaces des courbes de Gauss à la surface totale du diagramme.

Deux courbes de Gauss contiguës chevauchent et possèdent ainsi une surface commune σ qui est évaluée 2 fois au cours de la planimétrie (voir figure 12, p. 64), tandis que la surface σ' n'est jamais estimée. La construction des courbes doit normalement respecter l'équivalence de σ et σ' , sinon une erreur évidente affectera le calcul de la proportion de chaque fraction.

Dans un grand nombre d'expériences, nous avons comparé la somme des surfaces des courbes de Gauss à la surface totale du diagramme déterminée par planimétrie. Dans presque tous les cas, l'erreur ainsi commise est pratiquement nulle : 0 à 0.5 % et ne dépasse jamais 1,5 %.

2. Planimétrie d'une même courbe de Gauss par deux opérateurs différents.

Voici l'exemple d'une décomposition en courbes de Gauss (fig. 6 D) planimétrée deux fois par deux personnes différentes entraînées à cette opération. Les résultats sont les suivants :

<i>Frac- tions</i>	<i>Fractions assimilées à</i>	<i>Pourcentages (1^{re} personne)</i>		<i>Pourcentages (2^{me} personne)</i>	
A	A	54	54,4	54,4	54,3
α_1	α_0	3,6	3,4	3,6	3,4
α_2	α_1	7,3	7,3	7,4	7,5
	α_2	8,3	8,3	8,1	8,2
β	β_1	6,9	7	6,8	6,8
	β_2	3	3	2,9	2,9
	γ_1	4	3,9	4	4
γ	γ_2	8,9	8,8	8,8	8,8
	γ_3	4	3,9	4	4,1
		100,0	100,0	100,0	100,0

Si l'on multiplie les exemples, on retrouve cette constance des résultats et l'on constate la quasi-similitude des proportions calculées par le même opérateur ou par deux opérateurs différents.

3. Planimétrie d'une même fraction décomposée en une ou plusieurs courbes de Gauss.

On a vu que par nécessité de construction il fallait parfois décomposer en deux courbes de Gauss le pic correspondant à une même fraction homogène. Voici quelques exemples de planimétries faites dans des cas où le choix entre une ou deux courbes en cloche est discutable. Ils se rapportent aux fig. 5 et 6 :

<i>Fig. 5 D</i>	<i>Fig. 6 A</i>	<i>Fig. 6 D</i>	<i>Fig. 6 D</i>
fract. pourcent.	fract. pourcent.	fract. pourcent.	fract. pourcent.
γ_1 11,3	γ_1 8,1	γ_1 4	β_1 6,8
γ_2 15,5	γ_2 8,1	γ_2 8,9	β_2 2,9
		γ_3 4	
Total 26,8	16,2	16,9	9,7
γ 29,8	γ 15,5	γ 19,2	β 9,7

Les différences de pourcentage que l'on peut trouver ainsi ne sont pas considérables. Mais par contre, les valeurs numériques que l'on peut tirer de chaque interprétation faite par plusieurs opérateurs sont très différentes. Il n'est que de considérer les diagrammes des fig. 3, 4, 5 et 6 pour s'en apercevoir. C'est pourquoi nous avons tenté de préciser la façon dont devait se faire la décomposition d'un diagramme en courbes de Gauss (voir mode opératoire).

TITRE II

Mode opératoire proposé

Nous avons cru bon de faire un exposé détaillé qui comporte des renseignements techniques précis suggérés par deux années de pratique. Les résultats décrits dans la deuxième partie de ce travail ont été obtenus de cette façon.

L'exposé du mode opératoire comprendra 3 parties :

- 1) Les conditions techniques.
 - 2) L'interprétation des diagrammes d'électrophorèse et la construction des courbes de Gauss.
 - 3) L'étude statistique de sérums normaux précisant la valeur des résultats que l'on est en droit d'attendre en travaillant dans les conditions opératoires décrites.
-

CHAPITRE I

Conditions techniques

PRÉPARATION DE LA BANDE DE PAPIER-FILTRE

La bande de papier-filtre présente deux faces : l'une d'apparence rugueuse, l'autre plus fine sur laquelle sera déposée la solution protéique. Tracer 3 traits de crayon perpendiculaires à la longueur : CD à 58 mm. d'une des extrémités, AB à 80 mm. de cette même extrémité et C'D' à 58 mm. de l'autre extrémité. La solution à examiner sera répartie le long de AB. CD et C'D' sont des repères pour la mise en place des bandes sur le support de l'appareil.

Immerger entièrement la bande de papier-filtre dans la solution tampon servant à l'électrophorèse. Attendre 10 minutes. Essorer grossièrement la bande entre deux épaisseurs de papier-filtre. Déposer quelques gouttes de tampon sur la partie horizontale striée du support. Faire adhérer le papier sur l'un des côtés du support, tendre légèrement, faire adhérer l'autre extrémité. Introduire le support dans la cuve, le trait AB étant situé du côté de la cathode. Poser le couvercle sur la cuve.

Attendre 15 minutes avant de déposer la solution de protéines, temps nécessaire à l'humidification régulière de la bande par le tampon.

DÉPOT DE LA SOLUTION PROTÉIQUE

Prélever la solution à analyser à la pipette de précision. En essuyer les bords extérieurs avec du papier-filtre. Appuyer son extrémité arrondie et rodée sur un carré de papier-filtre ; le liquide descend de lui-même. Faire affleurer le niveau du liquide à hauteur de la graduation choisie.

Pour le sérum sanguin, une prise d'essai de 8 mm³ (quelquefois de 10 mm³) est nécessaire pour que l'interprétation soit valable (facteur dépendant du taux de protéines). Pour analyser certaines solutions protéiques, la prise d'essai doit être encore bien supérieure : 30 à 40 mm³ et plus si l'on veut pouvoir déceler certaines fractions protéiques se trouvant en faible quantité.

Enlever le couvercle de la cuve et déposer la solution sur le trait AB sous forme d'une fine traînée. Opérer en maintenant la micro-pipette très verticale et en la promenant délicatement d'un lent mouvement de va-et-vient sur le trait de crayon en ayant soin de s'arrêter à 1 cm. de chacun des bords de la bande de papier-filtre. L'étalement se fait de lui-même. Il est cependant quelquefois nécessaire de souffler légèrement dans la pipette lorsque le liquide analysé est très visqueux. Prendre soin de ne pas crever le papier et d'étaler très régulièrement la solution à analyser, ce dernier point étant indispensable pour l'obtention de diagrammes homogènes. Un appui pour la main est souhaitable. Remettre le couvercle de verre. Brancher la cuve au redresseur (fiche noire à la cathode et rouge à l'anode). Faire passer le courant et régler la tension d'alimentation à 110 volts.

Laisser la séparation électrophorétique s'accomplir pendant 14 heures (1).

RÉVÉLATION DES BANDES

Arrêter le passage du courant avant d'ouvrir la cuve. Prendre garde qu'en soulevant le couvercle les gouttelettes condensées à la partie inférieure du verre ne tombent sur les bandes. Retirer le cadre et laisser sécher les bandes à la température ordinaire en position horizontale.

Dans une cuve de verre appropriée, verser la solution saturée de noir amide 10 B, préalablement filtrée pour éviter le dépôt des grains de colorant sur la bande de papier-filtre, et y plonger les bandes pendant 10 minutes. Agiter. Retirer la bande et la laisser égoutter.

(1) Certains auteurs préconisent de placer les cuves en chambre froide pour maintenir une température constante pendant la durée de l'électrophorèse (compensation de la chaleur dégagée par effet Joule). Nous avons vérifié la température à l'intérieur de la cuve au cours d'électrophorèses. L'augmentation moyenne de température est de 0°5 après 1 heure, de 1° après 2 heures, de 1°5 après 4 heures et de 2° après 14 heures. Il ne semble pas que la mise en chambre froide améliore nettement les résultats.

DÉCOLORATION

La décoloration des parties du papier non chargées de protéines s'effectue en plongeant successivement la bande dans différents bains du mélange méthanol-acétique. Les temps d'immersion du papier doivent être augmentés au fur et à mesure que l'on passe d'un bain dans un autre. Si l'on emploie des bains de décoloration neufs, laisser par exemple les bandes :

10 minutes	dans le	1 ^{er} bain	
20	»	»	2 ^{me} »
30	»	»	3 ^{me} »
1 heure	»	»	4 ^{me} »
2 heures	»	»	5 ^{me} »

ce qui porte la durée totale de la décoloration à 4 heures. Effectuer des agitations répétées au cours du passage dans chacun des bains.

La quantité de liquide utilisée dans chaque bain est fonction du nombre de bandes mises à décolorer simultanément. Les temps que nous donnons ci-dessus sont valables pour des bains de 1 litre servant à décolorer 3 bandes à la fois. Les bains peuvent resservir plusieurs fois, surtout les premiers. Pour le dernier lavage, il est recommandé d'employer un mélange méthanol-acétique neuf.

Si l'on utilise des bains qui ont déjà servi plusieurs fois, prolonger la décoloration jusqu'à obtention d'une bande dont le fond non chargé de protéines ne soit plus que faiblement teinté en bleu (1).

Plonger les bandes décolorées dans de l'éther pendant 2 ou 3 minutes. Laisser sécher à l'air, ce qui ne demande alors que quelques minutes.

Remarque. — Récupération du mélange méthanol-acide acétique utilisé pour la décoloration du fond des bandes ayant subi l'action du Noir Amide.

Le procédé préconisé par le constructeur de l'appareil est la distillation. Cette méthode présente des inconvénients :

- 1° Formation d'acétate d'éthyle au cours du chauffage.
- 2° Impossibilité de récupérer l'acide acétique.
- 3° Passage d'une partie de l'acide acétique ou d'acétate d'éthyle dans le distillat (le titre en acide a été vérifié).

Nous avons utilisé l'adsorption sur charbon végétal activé R. P. qui a l'avantage de permettre la récupération du mélange dans les proportions désirées.

(1) Une technique de décoloration plus intéressante consiste dans une extraction du colorant en excès par lixiviation à chaud dans un appareil du type KUMAGAWA (voir DREVON, 19).

La filtration continue sur colonne est apparue comme un procédé lent et peu commode, le charbon devant être renouvelé fréquemment.

Aussi, nous avons préféré réaliser un simple contact en récipient fermé pendant 24 heures entre le mélange à décolorer et une quantité suffisante de charbon. Au bout de ce temps, une simple filtration sur papier permet d'avoir un mélange clair prêt à l'emploi.

WOLFF R. et MAGNIN P. (64) ont critiqué le procédé de récupération du mélange méthanol-acide acétique par le charbon. Ces auteurs ont prétendu, en effet, que le liquide plusieurs fois régénéré était susceptible d'enlever une partie du colorant fixé sur les protéines. Ils ont pensé que ce fait était imputable à l'accumulation dans le solvant des sels tampons dont le papier est imprégné au cours de l'électrophorèse.

Pour notre part, nous n'avons jamais constaté qu'un mélange récupéré décolore plus fortement les protéines qu'un mélange neuf. D'abord, il semble que lors de son passage dans les solutions de lavage, la bande de papier ait déjà abandonné dans la solution de colorant le tampon qu'elle retenait et WOLFF et MAGNIN ont montré que le tampon mélangé au colorant ne modifiait pas la teinte des protéines. Ensuite, pour justifier expérimentalement leur point de vue, ces auteurs ont laissé séjourner pendant 24 heures les bandes de papier dans le mélange méthanol-acétique additionné de quantités croissantes de tampon. Ce laps de temps est très supérieur à la durée habituelle du lavage et l'on est en droit de se demander si une décoloration aussi poussée n'est pas susceptible de provoquer à elle seule les différences constatées. La décoloration au Kumagawa résout d'ailleurs le problème de façon plus heureuse.

EVALUATION PHOTOMÉTRIQUE DE LA TENUEUR DES BANDES EN PROTÉINES

Immerger les bandes 15 minutes dans le mélange huile de paraffine + α -bromonaphtalène (1).

Essorer légèrement la bande ainsi rendue transparente et la placer entre les 2 lames de verre du photomètre en prenant soin de ne pas inclure de bulles d'air dont la présence fausserait la lecture. Pour ce faire, poser délicatement la bande de papier sur la première plaque en commençant par une extrémité et en progressant lentement. Poser ensuite la deuxième plaque de verre sur la deuxième face de la bande en opérant de la même façon. Si, malgré ces précautions, quelques bulles se sont formées, les chasser vers l'extérieur en appuyant au centre de la plaque et en dirigeant progressivement cette pression vers le bord.

Essuyer soigneusement les plaques de verre à l'extérieur avec un tampon de papier-filtre. Introduire alors l'en-

(1) Nous avons utilisé avec autant de succès l'huile de paraffine seule.

semble composé des lames de verre et de la bande colorée dans le châssis denté, la ligne correspondant à la piste de départ de la solution protéique étant placée du côté du zéro de la graduation. Vérifier la position de repos du galvanomètre en agissant sur la vis de rappel de manière à amener l'aiguille du cadran sur le trait le plus à gauche de l'échelle. Allumer l'ampoule du photomètre et la laisser chauffer 5 minutes. Introduire le châssis denté. Faire le zéro sur la graduation de droite du cadran lorsque paraissent les premiers millimètres de la bande. Déplacer le châssis vers la droite de manière à amener AB au-dessus de la fente lumineuse.

Commencer alors la lecture en déplaçant le cadre millimètre par millimètre. Les intensités lues à l'ampèremètre sont portées en ordonnées sur une feuille de papier millimétré en regard des déplacements inscrits sur l'axe des abscisses. On obtient de bonnes courbes en représentant par une longueur de 2 mm. chaque division de l'ampèremètre et chaque avancée de 1 mm. sur la bande.

Si l'on doit conserver la bande, éliminer par l'éther le liquide ayant servi à la rendre transparente.

CHAPITRE II

Interprétation des diagrammes d'électrophorèse

Construction des courbes de Gauss

La décomposition d'un diagramme d'électrophorèse en courbes de Gauss élémentaires repose sur les principes suivants :

1° Les sommets des « pics » indiquent la présence d'une fraction indépendante.

2° Les verticales abaissées des minimum du diagramme délimitent les zones dans lesquelles se placent les fractions successives.

3° La teneur du mélange en un constituant donné est proportionnelle à la surface délimitée par la courbe de Gauss correspondante.

Après avoir tracé point par point, sur papier calque, le relevé photométrique, retourner le papier (voir plus loin conseil pratique) et opérer comme suit :

— Abaisser, des maxima et des minima du diagramme, une perpendiculaire à l'axe des abscisses (fig. 12, 1°).

— Projeter sur le diagramme, à l'agrandissement convenable, les familles de courbes de Gauss reproduites sur microfilms, en faisant coïncider le sommet des courbes de Gauss avec le sommet des pics successifs, et la base des courbes avec l'axe des abscisses. Repasser au crayon le tracé le mieux adapté à la forme du diagramme.

— Il est recommandé de commencer la décomposition par un « pic » nettement marqué et dont la forme se rapproche le plus de celle de l'une des courbes en cloche du micro-

film. C'est le cas par exemple du pic correspondant à l'albumine dans un sérum sanguin.

Remarque. — Si le pic des albumines présente une légère dissymétrie, comme c'est le cas dans l'exemple choisi, tracer l'axe en joignant les milieux des segments de droite $a_1 a'_1$ — $a_2 a'_2$ — $a_3 a'_3$ — tracés à différents niveaux en menant des parallèles à l'axe des abscisses (fig. 12-1°). Ce procédé paraît meilleur que celui qui consiste à abaisser la perpendiculaire à l'axe des abscisses à partir du sommet s , puis à tracer la branche sx' , symétrique de la branche sx (fig. 12-4°). Ce dernier procédé, en effet, oblige à inclure deux ou plusieurs courbes de GAUSS à l'intérieur d'une fraction protéique manifestement homogène.

— Les courbes principales (A, alpha, bêta, gamma...) une fois tracées, il est souvent nécessaire de dessiner des courbes secondaires (alpha 0, bêta 2, etc... ; fig. 12-3°) telles que leur composition avec la courbe principale immédiatement voisine redonne le diagramme lui-même. Pour tracer ces courbes secondaires, dont il ne faut pas abuser, on se laissera guider par les trois principes suivants :

1° Le croisement de deux branches sera fait sur le milieu des verticales abaissées des minima.

2° Les extrémités droites et gauches des courbes de Gauss secondaires (toujours obtenues par projection), rejoindront le pied de la courbe de Gauss non contiguë.

N. B. — Il arrive que cette dernière construction soit possible sur la courbe de GAUSS principale de droite et non sur celle de gauche (fig. 12-2° entre A et alpha 2). On s'efforce alors de trouver une courbe intermédiaire respectant à la fois les fluctuations du diagramme (c'est le cas de alpha, par exemple) et le principe de la « section médiane », c'est-à-dire telle que la verticale passant par le point de rencontre des deux branches soit divisée en deux parties égales (point M entre M1 - M2, fig. 12-3°).

3° Les surfaces telles que sigma, sigma' (fig. 12-4°) devront être égales. L'œil apprécie assez correctement cette égalité.

Remarque. — Certaines considérations, valables surtout pour les sérums — dans lesquels des recoupements de la méthode électrophorétique par la méthode chimique sont possibles — conduisent parfois à dissocier une courbe principale telle que gamma en deux courbes secondaires telles que gamma 1 et gamma 2. La construction devra évidemment permettre de vérifier la condition $\text{gamma} = \text{gamma } 1 + \text{gamma } 2$ (fig. 12-4°).

Conseil pratique.

Les courbes ainsi tracées doivent pouvoir être réajustées afin de respecter la forme même des courbes de Gauss et les différents principes énoncés : c'est la raison pour laquelle il est recommandé de tracer les courbes au crayon, et *au verso* du diagramme établi sur papier calque. De la sorte, les

essais successifs, les coups de crayon et de gomme ne touchent pas le tracé lui-même. Lorsqu'on croit être parvenu à la meilleure décomposition possible, on peut, en remplaçant la feuille côté recto, dessiner au net sur cette face le tracé définitif.

Vérification :

En planimétrant toutes les courbes de Gauss ainsi tracées (ou en déterminant leur surface par le calcul ou par les tables) la somme des surfaces élémentaires doit être égale à la surface totale comprise entre le tracé du diagramme et l'axe des abscisses. La surface totale ne peut — bien entendu — être connue que par planimétrie.

PLANIMÉTRIE

Pour évaluer à l'aide du planimètre la surface de chacune des courbes de Gauss obtenues, fixer la feuille de papier sur une surface plane et placer le traçoir de l'appareil sensiblement au centre de gravité de la courbe ; le bras mobile du traçoir doit alors former avec l'autre bras un angle à peu près droit. Amener le traçoir en un point déterminé de la courbe. Noter le chiffre lu : les centaines et les dizaines sont inscrites sur le cylindre et le vernier donne les unités. Décrire rigoureusement la courbe avec le traçoir dans le sens des aiguilles d'une montre et revenir au point de départ. La différence des lectures avant et après le parcours donne la surface de la courbe. Un coefficient permet de convertir les unités planimétriques en unités de surface si on le désire.

La surface de chacune des courbes ainsi planimétrée est exprimée en pourcentage de la somme des surfaces de toutes les courbes.

REMARQUES GÉNÉRALES :

Inégalités du diagramme. — Le relevé, millimètre par millimètre, de la densité optique du papier, fixé et coloré, en fonction des elongations conduit à un tracé présentant de petites irrégularités dont il n'y a pas lieu de tenir compte. Un tracé tel que celui de la figure 12-6° sera interprété comme si la courbe était continue comme en 12-5°.

Chevauchement des extrémités des courbes de Gauss. — Il arrive que les pieds de deux courbes de GAUSS non voisines chevauchent légèrement l'un sur l'autre. On doit en tenir compte en abaissant légèrement le sommet de la courbe construite entre les

deux courbes qui chevauchent. C'est ce qui a été fait dans le tracé de la courbe alpha 0 (fig. 12-3°) pour tenir compte du chevauchement (indiqué par les hâchures) des courbes A et alpha 1.

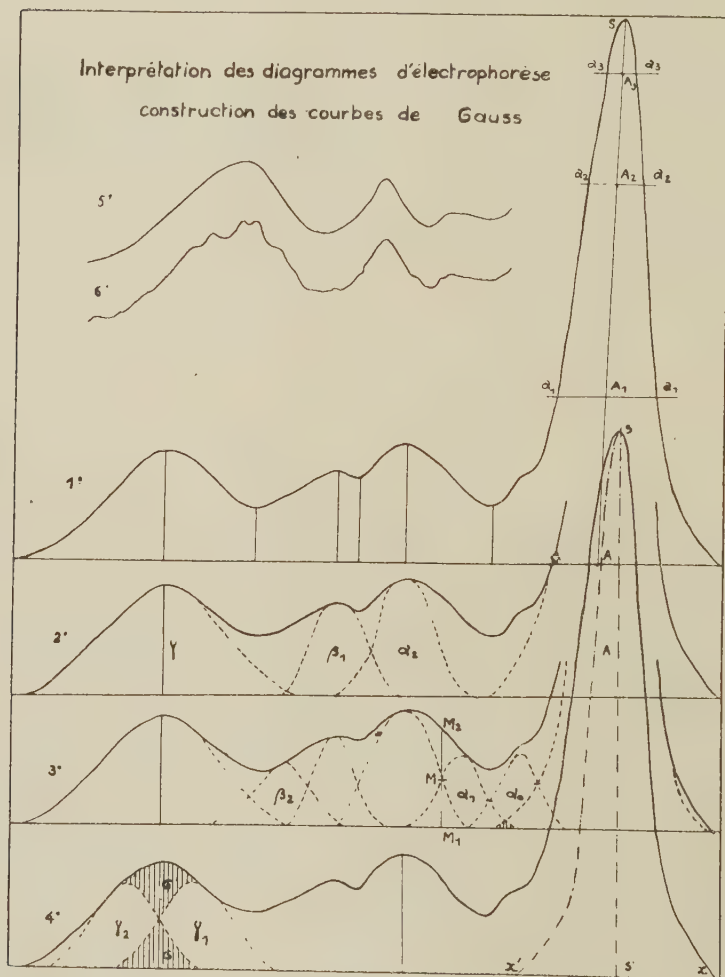


FIG. 12.

Interprétation des diagrammes d'électrophorèse.
Construction des courbes de Gauss.

Etude des sérums normaux

Pour le but que nous nous proposons, il importait de faire l'« étalonnage » de la méthode électrophorétique. Nous l'avons réalisé à partir de sérums d'individus sains, analysés en assez grand nombre pour pouvoir appliquer à l'ensemble des résultats la méthode de statistique graphique qu'autorise la construction préalable du « diagramme des fréquences groupées ».

Nous rappellerons brièvement en quoi consiste un diagramme des fréquences dont l'application aux données biologiques a fait l'objet d'une mise au point à laquelle nous renvoyons (17). Tout résultat biologique portant sur une « population » assez importante est soumis à de larges variations. Or, il est intéressant de connaître non pas les valeurs extrêmes qui sont exceptionnelles, ni la moyenne des résultats, mais la *fréquence* avec laquelle se retrouve une valeur déterminée de la variable.

Sur un graphique à coordonnées rectangulaires, on porte en ordonnées les valeurs Y de la variable et en abscisses le pourcentage X des déterminations ayant donné une valeur inférieure ou égale à une valeur Y de la variable (fréquences groupées).

Nous avons utilisé la méthode statistique pour l'étude d'une série de sérums dits « normaux » fournis par des individus cliniquement sains, et nous avons établi un diagramme des fréquences :

a) De la mobilité relative de chacune des fractions α_1 , α_2 et β -globulines en fonction de l'espace $\gamma - A = 100$ ($\gamma - A$ représente la distance entre les pieds des verticales des courbes de Gauss correspondant aux pics de la γ -globuline et de l'albumine).

b) Des proportions de chacune des fractions : albumine, α_1 , α_2 , β et γ -globulines.

A titre d'exemple, nous donnons la représentation graphique du diagramme des fréquences portant sur les proportions des albumines (tampon véronal-acétate de pH = 8,6) (figure 13).

DIAGRAMME des FRÉQUENCES

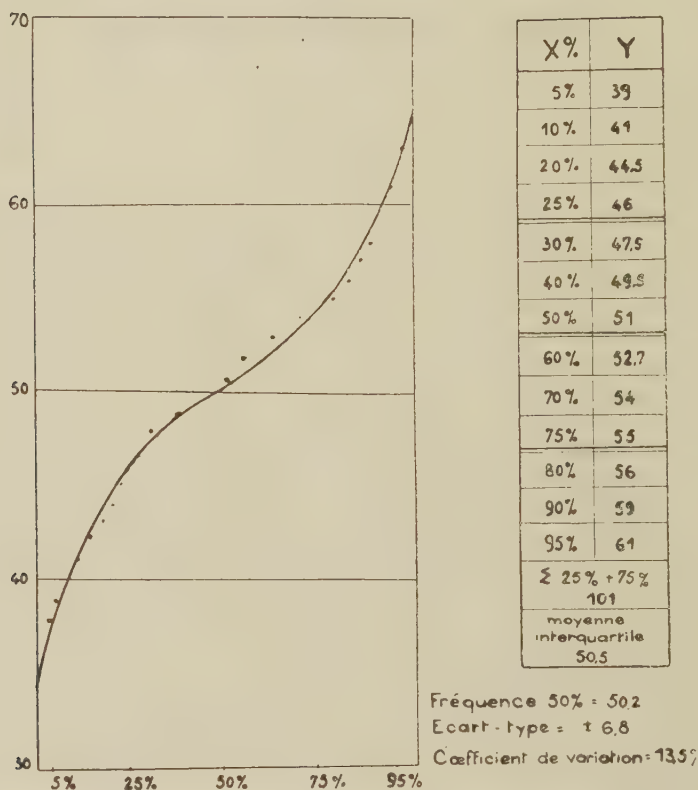


FIG. 13. — Diagramme des fréquences de la proportion des albumines. Electrophorèse en tampon véronal-acétate de pH = 8,6. — En abscisses : pourcentage de fréquence. — En ordonnées : valeurs des proportions.

Des constructions identiques à celles de la figure 13, faites pour chacune des données, permettent de fixer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation, tels qu'ils figurent au tableau IV ci-dessous :

Ainsi se trouvent nettement situés — quant à leur précision — les résultats que l'on est en droit d'attendre de la

TABLEAU IV

Positions et proportions des protéines sériques dans l'électrophorèse sur papier, appareil Elphor H, papier Whatman n° 1, durée d'électrophorèse : 14 heures.

1°) Tampon véronal-acétate, pH = 8,6, $\mu = 0,1$, coloration : Noir Amide 10 B.

(35 cas)	Positions $\gamma - A = 100$				PROPORTIONS			
	β	α_2	α_1	γ	β	α_2	α_1	A
Moyenne	34,6	55,2	77	19,2	13,6	10,5	5,2	50,2
Ecart-type $\pm$..	2,6	3,5	2,7	3,9	1,6	1,9	1,4	6,8
Coefficient de variation % ..	7,5	6,3	3,5	21,5	11,8	18	27	13,5

2°) Tampon aux phosphates, pH = 7,15, $\mu = 0,13$, coloration : Noir Amide 10 B.

(70 cas)	Positions $\gamma - A = 100$				PROPORTIONS			
	β	α	γ	α	β	α	α	A
Moyenne	41	66,2	22		13,7	8,4		54,3
Ecart-type $\pm$	3,5	3,6	5		2,7	3,6		8,7
Coefficient de variation %	8,5	5,45	23		19,7	43		16

méthode d'électrophorèse sur papier dans les conditions opératoires décrites où interviennent :

- a) Le type de l'appareil (cuves, photomètre).
- b) Le colorant employé.
- c) Les conditions opératoires proprement dites : nature du tampon, pH, température, durée de l'électrophorèse.
- d) L'interprétation des diagrammes.

Il convient, en matière de conclusion, d'insister sur le fait que ces résultats ne sont pas comparables avec ceux obtenus avec un autre type d'appareillage dans des conditions opératoires différentes.

En particulier, ce serait faire une grave erreur que de vouloir mettre en parallèle les résultats d'une électrophorèse sur papier, avec coloration des protéines par teinture au noir amide 10 B, avec ceux fournis par l'électrophorèse libre selon Tiselius, avec lecture réfractométrique des gradients de concentration. Il n'est pas non plus exclu que des différences systématiques se produisent en électrophorèse de zone sur papier, en relation avec l'appareillage ou avec le mode de teinture. Ces restrictions faites, nos conclusions finales resteront valables puisque notre principe de travail a consisté essentiellement en une *comparaison*, toutes les conditions des mesures restant identiques.

Deuxième Partie

**APPLICATION DE LA MÉTHODE
D'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER
A L'ÉTUDE
DES TISSUS CANCÉREUX**

Dans l'étude des protéines des tissus cancéreux, trois considérations nous ont guidé :

1) Considérer le problème de l'évolution du cancer sous son angle cellulaire réel en utilisant comme matériel de travail la tumeur elle-même.

2) Envisager le cas des cancers *spontanés* dont le stade initial de croissance est encore fort mal connu et dont le processus évolutif est certainement très différent de celui des tumeurs provoquées (24).

3) Utiliser exclusivement l'électrophorèse de zone qui seule pouvait nous permettre *d'isoler* éventuellement les protéines.

L'étude des protéines tissulaires par électrophorèse a déjà donné lieu à de vastes travaux et les résultats publiés sont nombreux. Les auteurs utilisent essentiellement les appareils à cuve (électrophorèse libre) dont le principe est celui proposé par TISELIUS. Mais, en dehors de son prix coûteux, cet appareil offre le désavantage de nécessiter une dialyse préalable des extraits tissulaires. BOSCH (11) et CREPAX (15) étudient ainsi les protéines musculaires du lapin. MILLER et ses collaborateurs (46) celles de la souris. KIRKHAM et THOMAS (34) font l'électrophorèse des protéines des noyaux cellulaires, et SOROF et ses collaborateurs (54) (55) étudient par la même méthode les tumeurs provoquées du rat. L'électrophorèse de zone a été plus rarement utilisée. Cependant, l'électrophorèse sur papier a trouvé emploi pour l'étude des protéines cellulaires. Ainsi, HENNING et ses collaborateurs (32) étudient lymphocytes, leucocytes, tissu lymphatique et foie.

TITRE 1

La méthode utilisée

L'investigation des protéines tissulaires s'effectue en plusieurs temps :

- 1) Prélèvement des tissus.
- 2) Extraction des protéines par les méthodes de broyage ou de congélation-décongélation.
- 3) Electrophorèse proprement dite.

Nous ne décrivons pas ici la conduite de l'électrophorèse qui a déjà fait l'objet d'une étude spéciale (1^{re} partie), mais nous nous attacherons à exposer et justifier la façon dont nous réalisons la mise en solution des protéines tissulaires.

PRÉLÈVEMENT

Les fragments tissulaires étudiés proviennent d'exérèses chirurgicales opérées sur des malades du Centre Régional Anticancéreux de Lyon. Pour chaque malade examiné, les prélèvements comportent :

- 1) un fragment de tissu cancéreux,
- 2) un fragment de tissu sain juxta ou péri-tumoral.

La nature des tissus est estimée par le chirurgien au moment du prélèvement. Pour être certain de la nature exclusivement saine ou cancéreuse de ces tissus, et éliminer les zones où il y a mélange des deux tissus, les prélèvements ont été assez distants. Ils sont de la taille d'une biopsie. Leur poids habituel est de l'ordre de un à deux grammes. Cependant, il nous est arrivé souvent d'examiner des fragments pesant moins de 0,50 g.

Aussitôt après ablation et dans la salle d'opération même, les fragments tissulaires sont introduits, sans antiseptique, dans des flacons stériles soigneusement bouchés que l'on conserve à la glacière jusqu'au moment de l'examen (1). Ce séjour en chambre froide dure de une à six heures.

EXTRACTION DES PROTÉINES TISSULAIRES

L'extraction des protéines solubles à partir des tissus ne peut se faire qu'après destruction de la structure cellulaire, réalisée par broyage des tissus en présence de sable à basse température. Ce mode d'extraction paraît le mieux adapté au but que nous voulions atteindre.

(1) Le séjour à la glacière évite la dénaturation des protéines et aussi l'attaque par les microorganismes. Certains prélèvements proviennent en effet de lésions infectées et peuvent être le siège d'une intense activité microbienne. On ne doit cependant pas s'exagérer l'importance des conditions de conservation des tissus ; une étude systématique nous a montré que l'infection des lésions n'a pas d'influence sur la composition protéique des tissus. Les antiseptiques sont à éviter car certains passent pour contracter des combinaisons avec les protéines et pour altérer leurs propriétés physico-chimiques (31) (20).

A) *Réactifs :*

1) Solution-tampon (identique à celle employée pour l'électrophorèse) (11) :

Phosphate disodique 2OH_2	0,023 M	
Phosphate monopotassique.	0,01 M	
Chlorure de potassium....	0,05 M	$\mu = 0,13 \quad \text{pH} = 7,15$
Conservation à la glacière.		

2) Sable lavé aux acides et calciné (MERCK).

B) *Mode opératoire :*

Laver abondamment le prélèvement avec la solution-tampon afin d'éliminer toute trace de sang. Exciser les petits vaisseaux. Essorer alors le tissu avec un tampon de gaze. Peser le tissu et le hâcher finement dans un mortier de verre refroidi extérieurement par de la glace. Faire le broyage avec un poids égal de sable et en ajoutant goutte à goutte le mélange-tampon que l'on utilise à raison de 1 ml. par g. de tissu. Le broyage doit se faire lentement de manière à ne pas produire d'échauffement. Laisser en contact pendant une heure en chambre froide. Centrifuger alors le broyat à grande vitesse et recueillir le liquide surnageant pour l'électrophorèse.

Avant d'adopter définitivement ce mode opératoire très simple, nous avons essayé plusieurs autres techniques dont nous dirons quelques mots :

I. — *Essai d'utilisation d'un microbroyeur.*

Dans le but de réaliser un broyage plus homogène, nous avons fait l'essai d'un microbroyeur de verre conseillé par certains auteurs (34) et construit d'après POTTER et ELVEHSEM (49):

Appareillage :

Ce microbroyeur est composé d'un tube de verre ayant la forme d'un tube à centrifuger dans lequel vient s'adapter un gros agitateur à extrémité renflée et arrondie. Ce renflement est rodé sur la partie interne du tube et y coulisse à frottement dur. Sa partie inférieure, celle qui vient en contact avec le fond du tube, est munie d'une vingtaine de pointes de verre favorisant la dilacération du tissu. L'agitateur est relié au moyen d'un tube de caoutchouc à vide à l'axe d'un petit moteur électrique placé verticalement et pouvant tourner à grande vitesse. Le microbroyeur est placé au sein d'un bac de glace pour empêcher l'échauffement produit au cours du broyage.

Mode opératoire :

Placer le tissu à broyer dans le fond du tube avec un peu de poudre de verre et la quantité de solution-tampon appropriée. Mettre le moteur en marche. En montant ou descendant le tube, on réalise sans aucun risque le broyage du tissu en quelques minutes.

Résultats :

Ce mode de destruction cellulaire ne nous a pas donné les résultats escomptés et s'est révélé inférieur au broyage au mortier en présence de sable. En effet, malgré le rodage du verre, malgré la présence de pointes sur l'agitateur et celle de poudre de verre dans le tube, le tissu tourne avec le piston et se trouve mal dilacéré. D'autre part, il se produit en un temps très bref un échauffement important qui n'est pas empêché par le refroidissement extérieur du micro-broyeur. Il peut en résulter une altération des protéines extraites.

II. — Essais de congélation-décongélation.

La congélation suivie de décongélation passe pour être une bonne méthode de destruction de la structure cellulaire (37) (31) (15). Cette destruction est d'ailleurs le reproche adressé à cette méthode lorsqu'on désire obtenir des coupes de tissus (38).

La formation des particules de glace pendant la congélation provoque une augmentation de volume du liquide intracellulaire et réalise l'éclatement de la structure cellulaire (31). Cependant, les congélations et décongélation répétées peuvent entraîner une dénaturation.

Mode opératoire :

Nous réalisons la congélation par détente de gaz carbonique liquide.

Mettre directement le tissu sur le détendeur à circulation de gaz carbonique faisant office de porte-objet. Le fragment tissulaire peut être au préalable placé au sein de quelques gouttes de solution-tampon qui favorise la congélation. Le « dégel » se fait par retour à la température ambiante.

Nous avons également essayé le broyage au mortier du tissu congelé, mais cette modification ne nous a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

Comparaison des méthodes de broyage au mortier et de congélation-décongélation :

Nos expériences n^{os} 68, 71 et 89 ont été faites en appliquant simultanément au même tissu l'extraction après broyage au mortier et la congélation-décongélation en présence de tampon aux phosphates de pH = 7,15. L'électrophorèse a ensuite été pratiquée avec ce même tampon.

Résultats :

Le procédé par gel et dégel successifs ne permet pas d'obtenir un liquide extractif assez riche en protéines cellulaires et conduit à l'obtention de diagrammes électrophorétiques moins nets que le broyage en présence de sable. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas retenu ce procédé.

CONDITIONS D'EXTRACTION

Choix du tampon.

Nous avons donné les deux formules de solutions-tampon que nous avons utilisées (voir 1^{re} partie).

Si, pour l'électrophorèse d'un sérum, l'emploi du tampon véronal-acétate de pH = 8,6 est pleinement justifié puisqu'il conduit à la séparation de cinq fractions protéiques (albumines et globulines α_1 , α_2 , β et γ) au lieu de quatre en utilisant le tampon aux phosphates (albumines, α , β et γ globulines), il n'en est pas de même lorsqu'il s'agit des tissus.

Nous avons vérifié la valeur de l'extraction et de l'électrophorèse des protéines tissulaires avec la solution-tampon phosphatée de préférence au tampon véronal-acétate dans deux séries d'expériences portant sur les tissus sains et cancéreux du sillon glosso-pharyngé et de la parotide.

Expériences n^{os} 62 et 115.

L'extraction des protéines tissulaires est faite par broyage au mortier (technique décrite ci-dessus) en utilisant dans les mêmes conditions d'expérience, d'une part le tampon phosphaté, et d'autre part, le tampon véronal-acétate, à raison de 1 ml. par g. de tissu.

Les électrophorèses sont conduites parallèlement avec un tampon identique à celui ayant servi à l'extraction.

Les avantages résultant de l'utilisation du tampon aux phosphates de pH = 7,15 apparaissent nettement :

- a) nombre de fractions séparées plus important : quatre au lieu de deux dans le tissu parotidien sain ;
- b) détails du diagramme plus accentués : sommets plus élevés, taches plus nettes et mieux séparées.

Le nombre des fractions protéiques tissulaires séparées et leur concentration est donc plus important lorsque l'extraction des protéines et leur étude électrophorétique sont

conduites en tampon aux phosphates de $\text{pH} = 7,15$ que lorsqu'elles sont effectuées en tampon véronal-acétate de $\text{pH} = 8,6$.

N. B. — Nous avons pensé pouvoir effectuer l'électrophorèse directe du broyat tissulaire déposé sur la ligne de départ de la bande de papier-filtre sans avoir recours à une extraction préalable par le mélange-tampon.

C'est l'objet de nos expériences n^{os} 10, 11, 14, 15, 20, 43 et 50.

Ces expériences ont porté :

- a) sur des organes animaux : foie, rein et muscle de lapin ;
- b) sur des tissus humains : sein (tissu sain) et vulve (tissu cancéreux).

Elles ont consisté à faire migrer parallèlement dans la même cuve d'électrophorèse en tampon phosphates à $\text{pH} = 7,15$:

a) d'une part, un broyat obtenu par simple trituration au mortier en présence de sable sans addition de tampon. La pulpe obtenue est déposée sur la piste de départ à l'aide d'une tige de verre effilée ;

b) d'autre part, un broyat du même organe prélevé dans les mêmes conditions et dont les protéines ont été extraites par la méthode décrite ci-dessus.

L'électrophorèse directe du broyat tissulaire montre, après coloration de la bande de papier, des taches séparées par de nombreuses traînées qui ne modifient pas l'allure générale du diagramme, mais rendent aléatoire son évaluation quantitative. L'électrophorèse du liquide d'extraction au contraire nous permet de retrouver les mêmes fractions bien séparées et sans aucune « traînée ».

L'intérêt de mettre les protéines en solution avant électrophorèse est donc évident. Nous n'avons pas poussé davantage cette tentative.

En résumé : le principe de travail adopté est le suivant :

1) Extraction des protéines par broyage au mortier en présence de sable purifié et de tampon aux phosphates de $\text{pH} = 7,15$.

2) Electrophorèse sur papier de 14 heures au sein de ce même tampon.

TITRE II

Les résultats obtenus

Pour chaque expérience groupant tissu cancéreux et tissu sain péri-tumoral, nous avons noté les renseignements suivants se rapportant au cas étudié :

- a) Localisation de la tumeur.
- b) Age et sexe du malade.
- c) Nature de la lésion : ouverte ou fermée, surinfectée ou non.
- d) Appréciation de la gravité de la maladie et de la malignité de la tumeur au moment de l'opération selon les indications du chirurgien. L'évolution de la maladie a été contrôlée ultérieurement.
- e) Traitement reçu par le malade avant l'intervention.
- f) Résultats histologiques.

A. — Localisation des tumeurs.

Les tumeurs (66 cas étudiés) peuvent être classées en six groupes (1) :

- Groupe 1 : Tumeurs du col utérin, de la vulve, du vagin et de la vessie (17 cas).
- Groupe 2 : Tumeurs du rectum (9 cas).
- Groupe 3 : Tumeurs de la peau (13 cas).
- Groupe 4 : Tumeurs du plancher de la bouche, de la langue, du pharynx et du larynx (15 cas).
- Groupe 5 : Tumeurs du sein et du testicule (3 cas).
- Groupe 6 : Tumeurs de la parotide et des glandes salivaires ou sous-maxillaires (9 cas).

(1) Classification proposée par le Chirurgien, Professeur Agrégé DARGENT.

B. — Age et sexe.

Sur 66 malades examinés, il y a 30 hommes et 36 femmes. Leur âge varie de 27 à 83 ans et la médiane de l'âge donnée par le diagramme des fréquences est de 57 ans.

C. — Nature de la lésion.

Pour 10 lésions fermées, il existe 36 lésions ouvertes et 20 lésions ouvertes infectées ou surinfectées.

D. — Gravité de l'état du malade.

Au moment du prélèvement, 16 cancers sur 66 étaient considérés comme non évolutifs.

E. — Traitement reçu.

Avant l'intervention, la plupart des malades n'avaient reçu aucun traitement et 12 seulement avaient été soumis à la radiothérapie.

F. — Les résultats histologiques.

Ont été dénombrés : 35 épithélioma, 8 tumeurs mixtes, 3 cylindromes, 3 carcinomes et 14 tumeurs diverses. 3 résultats histologiques sont demeurés inconnus.

Ces renseignements nous permettent de classer les résultats de différentes manières :

- 1° Statistique générale portant sur l'ensemble des cas.
- 2° Groupage d'après la localisation de la tumeur.

Si la méthode statistique au moyen des diagrammes des fréquences peut être utilisée pour la statistique générale en raison du nombre suffisant de cas étudiés, il n'en est malheureusement pas de même à l'intérieur de chaque groupe de localisation où le nombre de résultats obtenus est trop faible (1). Il faut donc considérer ce travail comme une étude d'orientation indiquant quel groupe de tumeurs est susceptible de fournir des résultats intéressants.

- 3° Résultats histologiques.
- 4° Résultats d'après l'infection des lésions.
- 5° Résultats selon l'évolutivité de la maladie.

(1) Nous avons été limité dans cette étude par le temps et par la nécessité de prendre sans discrimination les cas qui s'offraient à nous.

Expression des résultats

STATISTIQUE GÉNÉRALE

Nous avons appliqué la méthode des diagrammes des fréquences :

1. A l'étude des positions relatives dans l'espace γ -A des protéines des tissus sains d'une part et des tissus cancéreux d'autre part.

2. Aux proportions des albumines α , β et γ globulines des tissus sains et des tissus cancéreux.

L'étude de chacune des fractions protéiques des extraits tissulaires sains et cancéreux au moyen des diagrammes des fréquences nous a permis d'obtenir le tableau comparatif ci-dessous :

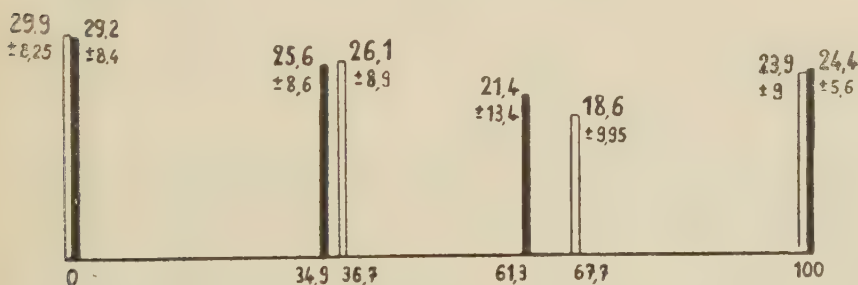


FIG. 14. — Statistique générale des tissus sains et cancéreux obtenue au moyen des diagrammes de fréquence [66 cas]. — Les positions des fractions sont exprimées en fonction de l'espace γ — A = 100.

Traits creux : tissus sains. Traits pleins : tissus cancéreux.

On remarque dans ce tableau la quasi identité de position et de proportion de chacune des protéines du tissu sain et du tissu cancéreux. Il faut cependant noter l'importance du coefficient de variation des mesures.

Considérées sous cet angle très général, les variations arrivent à se compenser, alors que l'étude d'un groupe donné de tumeurs révèle, au contraire, des différences marquées (cas du tissu parotidien par exemple).

LOCALISATION DES TUMEURS

Tumeurs du col utérin, de la vulve, du vagin et de la vessie.

Les tissus tumoraux de ce premier groupe montrent par rapport aux tissus sains correspondants :

- a) Une diminution des albumines.
- b) Une augmentation des β globulines.
- c) Les fractions α et γ globulines restent pratiquement constantes.

Les variations affectant les albumines et les β globulines sont également marquées lorsque l'on considère les prélèvements du col utérin seuls. Mais elles sont nulles au contraire dans les prélèvements vaginaux.

Tumeurs du col utérin, de la vulve, du vagin et de la vessie (17 cas).

	Positions $\gamma - A = 100$				Proportions			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Tissu sain	0	39,5	68,5	100	28,5	26,9	13,8	30,8
Tissu cancéreux	0	42,5	60	100	29	35,2	14,4	21,4
<i>Tumeurs du col utérin</i>								
(10 cas).								
Tissu sain	0	41	70	100	29,4	25,4	10,7	34,5
Tissu cancéreux	0	44	68	100	31	36	8	25
<i>Tumeur du vagin</i>								
(1 cas).								
Tissu sain	0	32	63	100	21,4	36,9	19,6	22,1
Tissu cancéreux	0	34	64	100	21,2	37,8	17	24
<i>Tumeurs de la vulve</i>								
(4 cas).								
Tissu sain	0	44	73	100	34	25,2	10,4	30,4
Tissu cancéreux	0		51	100	30,2	49,5		23

Dans les tumeurs de la vulve, on retrouve la chute des albumines, mais les fractions à migration moyenne (α et β globulines) se déplacent en bloc, leur taux global restant supérieur à la somme des α et β globulines du tissu sain.

Au cours de nos expériences, nous avons pu noter par ailleurs une composition protéique pratiquement identique des muqueuses vaginales et vésicales.

	<i>Positions</i> $\gamma - A = 100$				<i>Proportions</i>			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Muqueuse vaginale	0	32,5	65,5	100	22	35,5	20,8	21,7
Muqueuse vésicale	0	30	60	100	20,7	38,3	18,5	22,5

Tumeurs du rectum.

L'examen du tissu tumoral des tumeurs du rectum montre, par rapport au tissu sain correspondant :

- a) Une diminution sensible des β et γ globulines.
- b) Une augmentation des α globulines.

Les résultats histologiques se rapportant au tissu cancéreux indiquent : « épithélioma glandulaire intestinal », « adéno-cancer » c'est-à-dire : tumeurs ayant toutes leur origine dans la muqueuse intestinale et non dans l'épithélium malpighien de l'anus à type cutané.

<i>Tumeurs du rectum</i> (9 cas).	<i>Positions</i> $\gamma - A = 100$				<i>Proportions</i>			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Tissu sain	0	34	64	100	31,3	27,1	20,5	21,1
Tissu cancéreux.	0	28,5	57	100	27	23,7	27,8	21,5

Tumeurs de la peau.

Le tissu sain donne des diagrammes électrophorétiques assez difficiles à interpréter en raison de sa faible teneur en protéines extractibles dans nos conditions de travail. Le tissu tumoral voisin, par contre, révèle une plus grande richesse protéique en donnant des courbes à fractions nettes et bien séparées.

Cependant, on peut noter, d'une manière générale, dans le tissu cancéreux :

- a) Une diminution des mobilités relatives des α et β globulines.
- b) Une diminution nette du taux des albumines et des β et γ globulines.
- c) Une augmentation compensatrice des α globulines pratiquement doublées (ce résultat est à rapprocher de celui obtenu avec les tumeurs du rectum).

Les fragments de peau examinés ont été prélevés en différents endroits : joue, face, orbite, cuir chevelu, oreille. D'après les résultats histologiques, les prélèvements cancéreux se sont révélés comme étant des épithélioma spino-cellulaires, pavimenteux ou baso-cellulaires.

<i>Tumeurs de la peau (13 cas).</i>	<i>Positions $\gamma - A = 100$</i>				<i>Proportions</i>			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Tissu sain	0	47	71,5	100	36,3	21,6	12	30,1
Tissu cancéreux.	0	35,5	61	100	30,5	19,8	23,8	26

Dans un cas de tumeur mélanique du membre inférieur, l'extrait obtenu à partir du tissu sain ne comportait qu'une fraction protéique située dans la zone des albumines alors que le tissu cancéreux traité dans les mêmes conditions a donné les résultats suivants, révélant ainsi une différence profonde :

Fraction située dans la zone des albumines :	19,9 %
» » » » α globulines :	23,6 %
» » » » β globulines :	27 %
» » » » γ globulines :	29,5 %

Tumeurs du plancher de la bouche, de la langue, du maxillaire, du massif incisif, du larynx, du pharynx et de l'amygdale.

Ici encore, le tissu cancéreux montre une augmentation très nette des α globulines avec baisse légère de toutes les autres fractions.

Si l'on considère seulement les tumeurs du plancher de la bouche (histologie : épithélioma spino-cellulaires), on constate que l'augmentation des α globulines est encore plus nette puisque cette fraction est presque doublée.

Tumeurs du plancher de la bouche, de la langue, du maxillaire, du massif incisif, du larynx, du pharynx et de l'amygdale (15 cas).

	<i>Positions $\gamma - A = 100$</i>				<i>Proportions</i>			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Tissu sain	0	34	65	100	33,4	24	16,6	26,5
Tissu cancéreux.	0	35	63	100	30,6	22,8	23,8	22,6
<i>Tumeurs du plancher de la bouche (4 cas).</i>								
Tissu sain	0	35,5	66,5	100	35,9	22,9	11,6	29,6
Tissu cancéreux.	0	32,5	63,5	100	31,3	21,2	27,5	20

Tumeurs du sein et du testicule.

Les tumeurs du sein (épithélioma du type II et épithélioma intermédiaires) montrent trois fractions protéiques distinctes que nous avons identifiées comme étant des albumines et des globulines β et γ . Elles montrent par rapport au tissu sain correspondant :

a) Une augmentation nette des albumines et très importante des β globulines.

b) Une diminution marquée des γ globulines.

Le tissu sain, très riche en graisse, étudié séparément, ne nous a pas permis d'extraire une quelconque protéine et l'étude du lipidogramme semblerait dans ce cas particulièrement intéressante.

L'augmentation importante de l'albumine et la chute des γ globulines, que nous avons observées dans l'étude d'un séminome classique, rapproche les tumeurs du sein et du testicule, ce type de variations n'étant constaté que dans ce genre de néoplasmes (1). Malheureusement, ce sont là des constatations sans grande portée puisqu'elles n'intéressent que trois cas isolés.

	Zone des γ	Zone des β	Zone des α	Zone des A
<i>Tumeurs du sein</i> (2 cas).				
Chiffres moyens :				
Tissu musculaire sain.....	59	13,8		27,2
Tissu cancéreux	30,5	32		37,5
<i>Tumeur du testicule</i> (1 cas).				
Tissu sain	26,1	21,1	33,4	19,5
Séminome	11,9	15	35	38,1

Tumeurs de la parotide et des glandes salivaire et sous-maxillaire.

Ce groupe de tumeurs, qui a déjà fait l'objet d'une étude anatomo-clinique au Centre Régional Anticancéreux de Lyon (16), nous a donné des résultats intéressants.

L'étude du *tissu parotidien* sain a montré deux types de diagrammes électrophorétiques comprenant soit quatre soit cinq fractions protéiques dont l'identification est parti-

(1) Le rapprochement sein-testicule n'a d'ailleurs été fait que sur les indications du chirurgien, ces tumeurs représentant l'une et l'autre des tumeurs non ulcérées, c'est-à-dire non surinfectées et soumises à des influences hormonales.

culièrement délicate. Nous représentons en A et B (fig. 15) deux des courbes ainsi obtenues, ainsi que les moyennes des résultats se rapportant à chacun de ces types de diagrammes.

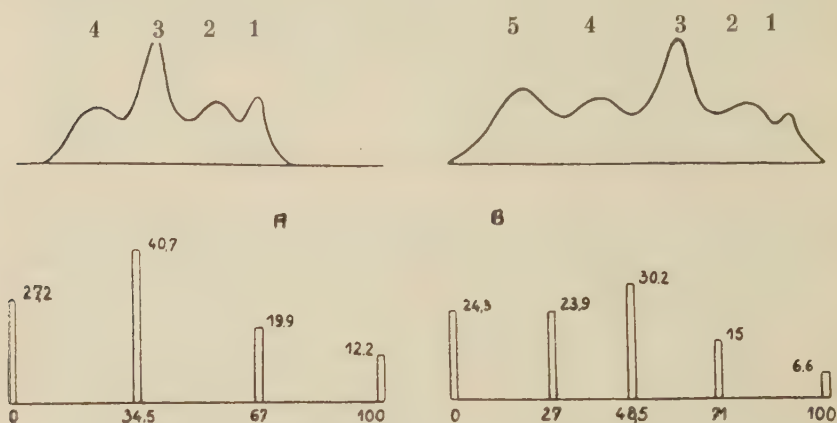


FIG. 15. — *Tissu parotidien sain.* — Diagrammes électrophorétiques montrant la présence de 4 (A) ou 5 (B) fractions.

Ces résultats sont chiffrés d'après nos conventions habituelles (positions relatives dans l'espace γ -A). En réalité, il semble que dans le cas particulier des diagrammes du type B à cinq fractions protéiques, la notation habituelle ne soit pas applicable ; en effet, on constate qu'aucune des positions des protéines dans les diagrammes du type A ne correspond à une protéine de même mobilité dans les diagrammes du type B. L'électrophorèse d'un sérum faite simultanément, nous montre que les fractions 1 et 2 correspondent respectivement aux albumines et aux α globulines. Le pic 3 se situe entre les β et γ globulines, le sommet 4 en arrière des γ globulines et lorsque la fraction que nous appelons 5 est présente, sa migration est encore plus lente. Le problème reste donc entier quant à l'appellation des protéines à migration lente.

Dans le *tissu parotidien tumoral* (1) et ceci s'est vérifié dans toutes les expériences que nous avons effectuées, nous n'avons jamais pu mettre en évidence la présence d'une protéine quelconque dans nos conditions d'extraction et d'électrophorèse habituelles (pH = 7,15 — tampon aux phosphates). Ces conditions se sont d'ailleurs montrées encore supérieures à celles réalisées avec un tampon véronal-acétate de pH = 8,6 qui n'a jamais permis d'obtenir que

(1) Voir la classification des tumeurs parotidiennes (16).

deux fractions visibles dans le tissu parotidien sain, le même vide protéique caractérisant toujours le tissu cancéreux.

Ces faits marquent donc une différence importante dans la composition des tissus parotidiens sains et cancéreux. Dans tous les cas étudiés, les histologistes ont invariablement répondu : « tumeur mixte de la parotide ».

Dans un cas non plus de tumeur mixte mais de *cyllindrome*, nous avons obtenu un résultat tout différent avec un tissu cancéreux contenant trois fractions protéiques distinctes : albumines, γ globulines et une fraction intermédiaire migrant entre les α et les β globulines. Par rapport au tissu sain, qui accuse une structure protéique classique à quatre fractions, le tissu cancéreux montre une élévation importante des albumines.

	Positions $\gamma - A = 100$				Proportions			
					Fract. 4	Fract. 3	Fract. 2	Fract. 1
Tissu parotidien sain	0	33,5	62	100	25,9	39,1	17,2	17,8
Cylindrome	0		42		28,1		38,1	33,8

Dans un cas se présentant à l'examen histologique comme une tumeur mixte, le tissu parotidien cancéreux était composé de deux fragments macroscopiquement distincts, l'un dur, l'autre mou, qui ont été analysés séparément. L'analyse de la partie molle de la tumeur n'a pas permis de mettre en évidence la présence des protéines rencontrées d'ordinaire dans les tissus tumoraux parotidiens. Par contre, le fragment dur s'est montré riche en protéines avec prédominance très nette des fractions à migration rapide sur les fractions à migration lente, ce qui est un aspect très différent de celui du tissu sain correspondant. On constate ainsi que, pour deux tissus cancéreux, certes différents, mais anatomiquement très voisins, il peut exister des différences accusées dans la répartition des protéines.

Lorsqu'on examine les *tumeurs mixtes* des glandes sous-maxillaires, le tissu cancéreux possède une certaine richesse en protéines représentée par une seule fraction ou constituée par plusieurs fractions migrant en bloc. Le tissu sain a une structure voisine de celle du tissu parotidien et montre quatre fractions distinctes, ne différant que par de faibles modifications de leur taux.

Dans un cas de tumeur de la glande sous-maxillaire chez un homme de 62 ans pour lequel les histologistes ont répondu « tumeur mixte et cylindrome », nous avons

observé la présence de plusieurs fractions protéiques partiellement dénaturées. Certains auteurs admettent que cette localisation chez l'homme serait cliniquement plus grave que chez la femme.

Conclusions.

En ce qui concerne la mobilité, on peut constater une légère tendance à la diminution des mobilités dans le tissu cancéreux avec quelquefois migration en bloc des protéines de mobilité moyenne (α et β globulines).

Dans la plupart des cas, les *albumines* sont légèrement diminuées. Elles sont augmentées d'une manière assez nette dans les tumeurs du sein et du testicule et dans un cas de cylindrome de la parotide (petit nombre de résultats)

Les α *globulines* constituent la fraction la plus souvent et la plus intensément modifiée. Elles ne sont jamais diminuées mais augmentées dans des proportions allant du simple au double.

Les β *globulines*, peu modifiées, sont : soit légèrement diminuées, soit augmentées.

Les γ *globulines* n'accusent pas de variations ou sont faiblement diminuées. Leur abaissement marqué dans un cas de séminome et deux cas de tumeurs du sein ne peut être retenu en raison du nombre trop faible de résultats.

HISTOLOGIE

Les tissus tumoraux examinés ont été répartis en deux groupes :

a) Epithélioma spino-cellulaires, pavimenteux, papillaires et malpighiens.

b) Tous les autres résultats histologiques comprenant : tumeurs mixtes, cylindromes et adéno-cancers.

Chacun de ces groupes représente sensiblement la moitié des observations recueillies.

Les résultats obtenus dans le cas des épithélioma sont comparables à ceux de la statistique générale des tissus cancéreux ou des tissus sains. On note seulement un ralentissement relatif de la vitesse de migration des β globulines.

Par contre, le deuxième groupe histologique montre une nette augmentation des α globulines et le même ralentissement de la vitesse de migration des β globulines.

	Positions $\gamma - A = 100$				Proportions			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Epithélioma	0	26,5	64	100	30,8	23,5	20,4	25,3
Tumeurs autres que épithélioma	0	30	56,5	100	25,4	25,8	27,4	21,4
Statistique générale tissus sains (fig. 14).	0	36,7	67,7	100	$29,9 \pm 8,25$	$26,1 \pm 8,9$	$18,6 \pm 9,95$	$23,9 \pm 9$
Statistique générale tissus canc. (fig. 14).	0	34,9	61,3	100	$29,2 \pm 8,4$	$25,6 \pm 8,6$	$21,4 \pm 13,4$	$24,4 \pm 5,6$

Que faut-il conclure de ces résultats ? Sans aucun doute que la structure protéique des tissus cancéreux est assez constante quelle que soit leur nature et que l'augmentation des α globulines souvent constatée par rapport au tissu sain est essentiellement le fait des tumeurs autres que les épithélioma d'origine malpighienne.

INFLUENCE DE L'INFECTION DES LÉSIONS*

Dans ce court chapitre, nous étudions l'influence possible de la flore microbienne sur la richesse protéique des tumeurs. Pour ce faire, nous distinguons 3 sortes de lésions :

- lésions fermées, en principe amicrobiennes,
- lésions ouvertes,
- lésions ouvertes infectées et surinfectées.

Les lésions fermées correspondent aux tumeurs de la parotide, des glandes salivaires, aux tumeurs du sein et du testicule.

L'infection des lésions n'a donc aucune influence sur la structure protéique des tissus cancéreux, comme cela ressort des chiffres ci-dessous :

	Positions $\gamma - A = 100$				Proportions			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Lésions ouvertes ...	0	35,5	61,5	100	30,4	24,4	21,7	23,5
Lés. ouv. infectées et surinfectées ...	0	36	60	100	28,4	27,9	22,6	21,1
Statistique générale tissus canc. (fig. 14).	0	34,9	61,3	100	$29,2 \pm 8,4$	$25,6 \pm 8,6$	$21,4 \pm 13,4$	$24,4 \pm 5,6$

INFLUENCE DE L'ÉVOLUTIVITÉ DE LA MALADIE

A propos de chaque observation, le clinicien a donné une appréciation de la tendance à l'évolution de chaque cas. Cette appréciation, basée sur une évaluation clinique fournie par le même observateur, est forcément assez subjective. Le chirurgien a toujours fixé ce coefficient d'évolutivité sans connaître les résultats chimiques et il est curieux de confronter cette évaluation avec les données analytiques.

Nous avons chiffré cette évolutivité en malignité allant de ± 0 à $+++$. Tous les prélèvements de malignité ± 0 ont servi à établir une statistique que nous avons comparée avec l'ensemble des résultats obtenus sur les tissus cancéreux.

On remarque essentiellement :

- a) une augmentation des α globulines ;
- b) une chute des β et γ globulines qui différencie assez nettement les tissus cancéreux peu évolutifs et les tissus d'évolutivité rapide.

	Positions $\gamma - A = 100$				Proportions			
	γ	β	α	A	γ	β	α	A
Tissus cancéreux non évolutifs	0	28	56,5	100	21	20,8	31,9	26,3
Statistique générale tissus canc. (fig. 14).	0	34,9	61,3	100	$29,2 \pm 8,4$	$25,6 \pm 8,6$	$21,4 \pm 13,4$	$24,4 \pm 5,6$

Comment interpréter ces variations ? La teneur plus élevée en γ globulines des tissus à évolutivité rapide pourrait être rapportée à une infection. Par contre, il faudrait parler du rôle des globulines α et expliquer leur diminution dans les tissus de malignité élevée. La diminution des α globulines dans le tissu cancéreux en évolution rapide reste sans explication actuellement mais doit être rapprochée de l'augmentation des globulines α signalée dans le plasma des cancéreux (33).

Discussion des résultats

C'est à la lumière d'une comparaison entre les résultats que nous avons obtenus dans l'analyse des *tissus* cancéreux et de ce que l'on sait classiquement sur les modifications des protéines *sériques* ou plasmatiques dans la maladie cancéreuse, que nous aborderons la discussion qui s'impose.

Il est clair que de nombreuses anomalies peuvent être constatées dans la composition protéique du sérum cancéreux. Nous les rappelons ci-dessous. On admet — plus par nécessité logique que par suite de preuves formelles — que les protéines plasmatiques « reflètent les activités des différents tissus ou organes de l'ensemble du corps ». Cependant tout prouve que de très nombreuses affections produisent des modifications similaires des protéines plasmatiques et ceci suggère que nombre des anomalies signalées sont produites par la réaction de l'hôte à la présence de la tumeur beaucoup plus que par la tumeur elle-même et le déversement dans le sang de ses produits de résorption.

Il faut d'ailleurs reconnaître avec WINZLER R.-J. (63) que nos moyens d'investigation sont encore très grossiers et que « c'est peut-être l'étude des fractions les moins abondantes, ou encore la connaissance de petites fractions absentes du plasma normal et qui peuvent être présentes dans le plasma cancéreux qui présenterait le plus d'intérêt ». Cette remarque est faite pour les protéines plasmatiques ou sériques, mais elle vaut aussi — et nous la faisons nôtre — pour les protéines tissulaires.

Il faut encore remarquer que la signification physiologique des modifications que l'on observe nous échappe encore presque complètement ; à quelques exceptions près (fibrinogène, protéine spéciale du type Bence-Jones) le *lieu de formation* des protéines dans l'organisme est encore une énigme.

Cette ignorance constitue — hélas — le leit-motiv de notre argumentation.

Il importe cependant d'étudier de plus près le sort de chacune des protéines : nous le ferons en les examinant par ordre de mobilité croissante :

γ Globulines.

Depuis que l'on attribue à cette fraction un rôle de vecteur des anticorps, de nombreuses investigations ont porté sur ses variations au cours de la cancérisation (1). Mais si quelques recherches immunologiques semblent en faveur de la présence — dans certains cas — d'anticorps spécifiques (voir WINZLER p. 526) aucune variation dans la teneur en γ -globulines n'a pu être démontrée. Une seule exception paraît être celle du myélome multiple et de certaines leucémies, encore que l'on hésite sur la nature de la fraction excédentaire. Dans cette affection la β -globuline paraît également augmentée, et nous verrons plus loin que le sens de cette augmentation n'était pas clairement établi par suite de la présence des lipides liés à cette fraction.

En fait, la fraction anormalement augmentée dans les myélomes présente souvent une mobilité [ADAMS et coll. (1)] intermédiaire entre celle des γ et des β -globulines. Homogène à pH 8,5 elle forme à pH 4,5 deux composés distincts [MEHL et GOLDEN (42)]. En admettant même l'existence d'une protéine nettement « anormale » du type Bence-Jones, dans le sérum des myélomateux, nous ne savons encore rien de net sur le lieu de sa formation, qui paraît être la moelle osseuse.

Dans les extraits tissulaires qu'il nous a été donné d'observer, l'absence de variation des γ -globulines constitue le fait dominant : aucun problème ne se pose donc à leur endroit.

β Globulines (et Euglobulines II).

VARGUES et ses coll. (61), (62) ont constaté dans le sérum des malades porteurs de tumeurs malignes une augmentation des β -euglobulines (quelquefois des α -euglobulines) et souligné que l'augmentation des β -euglobulines se relie directement à l'augmentation de la lipémie et de la cholestérolémie. ADNER (2) et BOSELLI (12) ont retrouvé les mêmes anomalies

(1) Dans le cas de *tumeurs infectées*, ce sont les γ -euglobulines (fraction EI_2 et EI_3 de SANDOR) de point isoélectrique 6,6-6,4 et constituées de γ -globulines de vitesse normale qui sont augmentées.

dans plusieurs types de tumeurs, en particulier dans les myélomes (3 cas sur 5). Les leucémies myéloïdes et lymphoïdes donnent lieu également à une hyper β -euglobulinémie considérable, qui serait en rapport avec le degré de l'infection.

Ces β -euglobulines (fraction E_{II} de Sandor) sont des protéines de point isoélectrique voisin de 6,0 et précipitent lorsqu'on amène le pH de 6,6 à 6. L'analyse électrophorétique les montre surtout constituées de β -globulines (50) dont on sait depuis longtemps que la caractéristique essentielle est la richesse en stérols et en phospholipides [BLIX, TISELIUS et SVENSON (10) ONCLEY (47)].

Nos recherches électrophorétiques sur le tissu cancéreux n'ont fait apparaître que de façon exceptionnelle une augmentation des β -globulines. Mais il faut se souvenir — et souligner une fois de plus — que la méthode d'électrophorèse sur papier colore *spécifiquement* les protéines. Dans une lipoprotéine elle ne colore que la fraction protéique. Nos résultats ne sont donc pas en contradiction avec ceux que nous venons de rappeler ; ils ne sont pas non plus en contradiction avec les résultats obtenus toujours sur le sérum par la méthode d'électrophorèse libre puisque cette méthode ne permet pas de dissocier la partie protéique de la partie lipidique, et que les mobilités et les taux des β -globulines sont en fait ceux de lipoprotéines plus ou moins chargées en lipides.

Tout ce qu'il est permis de conclure, c'est que l'hyper β -globulinémie fréquemment signalée dans le sérum des cancéreux ne paraît pas liée à une augmentation des globulines du tissu tumoral.

N. B. — La mobilité électrophorétique du fibrinogène est intermédiaire entre celle des γ et des β -globulines. Son augmentation dans le plasma cancéreux est nette, mais n'est pas spécifique de l'affection. Un moyen rapide d'appréciation a été décrit par PLAN dans sa thèse (48) sous le nom d'index de thermocoagulation plasmatique. Synthétisée selon toute vraisemblance dans le foie, il va sans dire que nous n'avons jamais rencontré cette protéine dans nos extraits tissulaires.

Globulines alpha.

On admet classiquement une augmentation des α -globulines dans le sérum des cancéreux, mais on sait fort peu de choses sur la signification physiologique de cette augmentation. Même ignorance si l'on s'adresse — pour étudier les α -globulines — à la méthode de précipitation fractionnée par l'alcool de Cohn ; le contexte physiologique fait complètement défaut. On sait seulement que l'hyper α -globulinémie

est liée autant aux infections et aux inflammations qu'au cancer (26). C'est la raison pour laquelle nous avons soigneusement recherché s'il y avait des différences significatives entre tissu tumoral infecté et non infecté : nous avons dû conclure que l'infection n'intervenait pas (voir p. 91).

Dès lors il faut reconnaître au moins deux origines à l'hyper α -globulinémie *sérique*. L'une peut être l'hyper α -globulinémie tumorale, l'autre pourrait être une réaction de l'hôte et n'a pas d'explication connue. Il faut une fois de plus déplorer notre ignorance du lieu de la formation ainsi que de la signification physiologique des différentes fractions protéiques du sérum.

α_2 Globulines.

Pour s'en tenir aux faits bien établis, on retiendra que la fraction α_2 , si nettement augmentée dans certaines tumeurs, est considérée comme la fraction vectrice des glucides. L'augmentation du « sucre protéique » connue depuis fort longtemps (travaux de BIERRY et coll. (9)) doit être rapprochée de l'augmentation de la copule protidique des α_2 -globulines. Il faut répéter à ce sujet ce que nous avons déjà dit au sujet des lipoprotéines : l'analyse électrophorétique libre mesure « en bloc » la mobilité et le taux des glucoprotéines ; l'électrophorèse sur papier avec coloration au noir amide individualise dans les glucoprotéines la seule copule protidique.

Il est donc intéressant de mettre en parallèle l'augmentation de l' α_2 -globuline et celle du sucre protéique ; ce parallèle a été tenté par VARGUES en ce qui concerne les euglobulines 5, dont on soit qu'elles sont précisément constituées par la fraction α_2 -globulinique. On sait d'ailleurs depuis les travaux de SEIBERT et coll. (1947) (30) qu'il existe une relation étroite même chez les individus normaux entre la teneur du sérum en α_2 -globulines et le taux des polysaccharides liés aux protéines, de même que l'on connaît depuis longtemps leur commune augmentation chez les tuberculeux et les cancéreux (45), (22).

α_1 Globulines.

On sait depuis longtemps que le sérum des cancéreux contient une proportion plus élevée que le sérum normal de protéines spéciales et de polypeptides. La méthode de Howe précipite ces protéines en même temps que l'albumine ; l'électrophorèse leur attribue une mobilité moindre que celle de l'albumine ; quant aux polypeptides on les dose classiquement par différence entre l'azote du défécât trichloracétique

et celui du défécât tungstique ou phosphotungstique. Le dosage peut être fait soit par la méthode de Kjeldahl, soit par détermination de l'index tyrosine. La méthode polarographique de BRDICKA (13) appliquée au liquide de défécation sulfosalicylique permet d'apprécier la teneur en cystine ou molécules riches en cystine. Cette teneur est augmentée chez le cancéreux, mais la réaction n'est pas spécifique de l'affection.

Les travaux de WINZLER ont permis d'identifier les substances responsables de la « vague » polarographique aux mucoprotéines ; ces mucoprotéines de point isoélectrique 3-4,5 migrent à pH 8,5 avec les α_1 -globulines.

Ainsi, plusieurs techniques différentes dans leur principe permettent la mise en évidence dans le sérum cancéreux de substances appartenant à la fraction globulinique α_1 . Ces différentes techniques ont d'ailleurs été proposées avec des fortunes diverses pour servir de « tests » non spécifiques aux états cancéreux. Mais aucune hypothèse valable n'a encore été faite sur la signification de cette α_1 -hyperglobulinémie.

Albumines.

Il semble que l'augmentation de la fraction α_1 aille de pair avec une diminution de l'albumine, fraction la plus mobile et la plus abondante des protéines sériques. La réaction de Kahn proposée en 1925 et étudiée par de nombreux auteurs entre 1925 et 1930, puis de 1941 à 1944 consiste essentiellement dans la mise en évidence de cette diminution de l'albumine, diminution qui n'a pas non plus un caractère spécifique.

Conclusions générales

1. — Les conditions pratiques donnant à l'électrophorèse sur papier une précision suffisante ont été définies.

2. — Appliquées à l'étude des protéines tumorales et des protéines du tissu sain qui entoure la tumeur, la méthode a permis de faire les constatations suivantes :

a) La comparaison statistique générale entre tissu sain et tissu cancéreux, sans distinction de localisation, ne montre que peu de modifications dans les mobilités et dans les taux respectifs des différentes fractions protéiques.

b) Par contre, si l'on s'adresse à certaines sortes de tumeurs, on trouve des variations parfois importantes se traduisant essentiellement par une augmentation des alpha-globulines.

c) Cette augmentation est plus marquée dans les tissus cancéreux non évolutifs que dans les tissus d'évolution rapide.

d) Les variations des autres protéines sont moindres. Les albumines sont légèrement diminuées. Les bêta-globulines sont augmentées dans quelques cas et les gamma-globulines, lorsqu'elles varient, sont faiblement abaissées.

e) Le degré d'infection des lésions n'a pas d'influence sur la composition protéique des tissus cancéreux.

f) Le tissu parotidien tumoral est caractérisé par l'absence de protéines extractibles dans nos conditions opératoires.

Le Doyen,
H. HERMANN

Le Président de la Thèse,
A. LEULIER

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 1^{er} Juillet 1955.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. ALLIX.

Bibliographie

Les pages de la thèse, où il est fait mention des publications citées, sont indiquées entre parenthèses après chaque référence.

1. ADAMS (W. S.), ALLING (E. L.), LAWRENCE (J. S.). — Cité par WINZLER (R. J.) (63). *Am. J. Med.*, **6**, 141-161, 1949 (94).
2. ADNER (P. L.). — On the use of euglobulin precipitation in demonstrating disturbances of serum pattern. *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, **56**, 241, 1952 (94).
3. ARDRY (R.). — Considérations nouvelles sur le dosage des protéines. *Ann. Biol. Clin.*, **7**, n^{os} 10-11-12, 407-415, 1949 (22).
4. ARDRY (R.). — Technique de précipitation des protéines suppléant à l'électrophorèse. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, n^{os} 3-4, 237-244, 1950 (15).
5. ARDRY (R.). — L'exploration clinique des protéines sériques. *Ann. Biol. Clin.*, **10**, 575-627, 1952 (15) (20).
6. ARDRY (R.). — Sur l'emploi des diagrammes interprétatifs des mobilités électrophorétiques. *Ann. Biol. Clin.*, **12**, 171-176, 1954 (34).
7. ARDRY (R.) et Mlle ABRIOUX (M.). — Considérations nouvelles sur le dosage des protéines. *Ann. Biol. Clin.*, **6**, n^{os} 9-10, 516, 1948 (30).
8. BENHAMOU (E.) et POLONOVSKI (J.). — Electrophorèse sur papier. Applications cliniques. *Ann. Biol. Clin.*, **11**, n^{os} 1-2, 81-98, 1953 (30).
9. BIERRY (H.), RATHERY (F.), and LEVINA (M.). — *Compte-rendu*, **173**, 56-57, 1921 (96).
10. BLIX (G.), TISELIUS (H.) et SVENSSON (H.). — Cité par WINZLER (R. J.). (63). *J. Biol. Chem.*, **137**, 485-494, 1941 (95).
11. BOSCH (M. W.). — Quantitative electrophoretic study of rabbit muscle proteins soluble in dilute salt solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, n^o 1, 61-86, 1951 (19) (71) (76).
12. BOSELLI (A.). — Sulla precipitazione isoelettrica della frazioni « elettroforetiche » della sieroglobuline. *Controlli elettroforetiche Boll. I.S.M.*, **29**, 1950 (94).
13. BRDICKA (R.). — Cité par WINZLER (R. J.), (63). *Klin. Wochenschr.*, **18**, 305-308, 1939 (97).
14. CREMER (H. D.) and TISELIUS (A.). — *Biochem. Zeitschr.*, **320**, 273-283, 1950 (15) (30).

15. CREPAX (P.). — Etude électrophorétique d'extraits de muscles doués de différentes propriétés morphologiques et fonctionnelles. *Bioch. Biophys. Acta*, **9**, 385-398, 1952 (71) (77).
16. DARGENT (M.). — Définitions et principes du traitement des tumeurs primitives malignes des glandes salivaires. *Acta*, Vol. **8**, n° 2, 359-371, 1952 (87) (88).
17. DREVON (B.). — Le diagramme de fréquence, représentation rationnelle des « Constantes Biologiques ». *C. R. Soc. Biol.*, **140**, 870-872, 1946 (65).
18. DREVON (B.). — Le « diagnostic chimique » des états cancéreux. *Biologie Médicale*, XLII, 382-434, 1953 (11).
19. DREVON (B.). — Perfectionnement à l'électrophorèse sur papier des protéines sériques : décoloration des bandes par extraction au Kumagawa. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 921-923, 1954 (24) (57).
20. DREVON (B.), FOURNIER (C.) et DONIKIAN (R.). — Mise en évidence de la fixation et du transport de certains médicaments par les protéines du sérum. *Réunion des Sociétés de Pharmacie du Sud de la France, Bordeaux*, 7-8 mai 1955. (75).
21. DURRUM (E. L.). — A microelectrophoretic and microionophoretic technique. *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2943, 1950 (15) (30) (31).
22. ELREDGE (N.) and LUCK (J. M.). — Electrophoretic studies on the water soluble proteins of liver during azo dye carcinogenesis in the rat. *Cancer Research*, **12**, 258-259, 1952. (96).
23. ESSER (H.), HEINZLER (F.) and WILD (H.). — Ein einfaches Verfahren der Einengung des Liquor cerebros spinalis zur Bestimmung der Eiweissfraktionen mit Hilfe der Elektrophorese in Filtrierpapier. *Klin. Wochenschr.*, **30**, 228-229, 1952 (23).
24. GELLHORN (A.). — A critical evaluation of the current status of clinical cancer chemotherapy. *Canc. Res.*, **13**, n° 3, 205-215, 1953 (71).
25. GORNALL, BARDAWILL et DAVID. — *Journ. of Biol. Chem.*, **177**, 751, 1949 (23).
26. GRABAR (P.). — Les Globulines du sérum sanguin. Masson édité, Paris, 1947 (36) (96).
27. GRASSMANN (W.). — Neue Verfahren der Elektrophorese auf dem Eiweissgebiet. *Naturwissenschaften, Dtsch.*, **38**, n° 9, 200-206, 1951 (30).
28. GRASSMANN (W.) et HANNIG (K.). — Trennung von Stocgemischen auf filterpapier durch ablenkung im elektrischen feld. *Z. Physiol. Chem.*, **292**, 32-50, 1953 (15) (18) (24).
29. GRASSMAN (W.), HANNIG (K.) et KNEDEL (M.). — Uber ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf filterpapier. *Deutsch. Med. Woch.*, **76**, 333-336, 1951 (15) (18) (24).
30. GREENSTEIN (J. P.) et HADDOW (A.). — *Academic Press Inc., Publishers, New-York*, 1953. *Advances in Cancer Research*, Vol. I, 503-548 (96).

31. HAUROWITZ (F.). — Chemistry and Biology of proteins. *Academic Press. Inc. publishers, N.-Y.*, 1950 (75) (77).
32. HENNING (N.), KINZLMEIER (H.), DEMLING (L.) et MANNUSS (E.). — Elektrophoretische untersuchung von Zelleiweisskörpern. *Klin. Wochensch.*, **30**, n^{os} 17-18, 390-391, 1952 (71).
33. HOFFMAN (H. E.) et SCHECHTMAN (A. M.). — Electrophoretic changes in proteins from livers of rats fed 4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Research.*, **12**, 2, 129-133, 1952 (92).
34. KIRKHAM (W. R.) et THOMAS (L. E.). — The isolation of globulins from cellular nuclei. *J. Biol. Chem.*, **200**, 53-57, 1953. (71) (76).
35. KOIW (E.), WALLENIIUS (G.) et GRÖNWALL (A.). — L'utilisation clinique de l'électrophorèse sur papier-filtre. Comparaison avec l'électrophorèse à tube en U selon la méthode de Tiselius. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, n^{os} 11-12, 1940-50, 1951. (41).
36. KUNKEL (H. G.), TISELIUS (A.). — Electrophoresis of proteins on filter paper. *J. Gen. Physiol., U.S.A.*, **35**, n^o 1, 89-118, 1951 (15) (24) (48).
37. LANGERON (M.). — Précis de microscopie. Masson, édit. Paris, 406-495-499, 1949 (77).
38. LISON (L.). — Histochimie et Cytochimie animales. Gauthier-Villars édit., Paris, 30, 1953 (77).
39. MACHEBŒUF (M.), DUBERT (J. M.) et REBEYROTTE (P.). — Micro-électrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant (Electrorhéophorèse). Etude théorique. Application à la mesure des mobilités électrophorétiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, n^{os} 3-4, 346-364, 1953 (48).
40. MACHEBŒUF (M.), REBEYROTTE (P.), Mlle BRUNERIE (M.). — Applications aux sérums pathologiques, aux urines et aux liquides d'ascite de la méthode de micro-électrophorèse sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, n^o 10, 1543-1551, 1951 (15).
41. MACHEBŒUF (M.), REBEYROTTE (P.), DUBERT (J. M.) et BRUNERIE (M.). — Microélectrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant (Electrorhéophorèse). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, n^{os} 3-4, 334-345, 1953 (48).
42. MEHL (J. W.) and GOLDEN (F.). — *J. Clin. Invest.*, **29**, 1214-1218, 1950 (94).
43. MERKLEN (F. P.) et MASSEYEFF (R.). — L'adsorption d'albumine, cause d'erreur dans l'appréciation quantitative des protéines sériques dans l'électrophorèse sur papier-filtre. *C. R. Soc. Biol.*, **146**, 1905-1908, 1952 (28).
44. MICHAELIS (L.). — *Biochem. Z.*, **234**, 139, 1931 (44).
45. MIDER (G. B.). — Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects : A review. *Cancer Research*, **11**, 821-829, 1951 (96).
46. MILLER (G. L.), GREEN (E. U.), KOLB (J. J.) and MILLER (E. E.). — Studies on the proteins of rhabdomyosarcoma and normal muscle of mice. *Cancer Research*, **10**, 141-154, 1950 (71).
47. ONCLEY (J. L.). — *Symposium on Nutrition*, **2**, 1950. *Plasma proteins*, 3-21 (95).

48. PLAN (R.). — Recherches sur la thermocoagulation plasmatique. Application au diagnostic des états cancéreux. *Thèse Doctorat en Pharmacie*, Lyon, 1951 (95).
 49. POTTER et ELVESHEM. — *J. Biol. Chem.*, **114**, 495, 1936 (76).
 50. SANDOR (G.) et DE MENDE (S.). — Systèmes globuliniques du sérum et l'immunité. VI. Etude électrophorétique des euglobulines et quelques considérations concernant leur nature. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 550-558, 1950 (95).
 51. SCHNEIDER (G.). — Brauchbarkeit und Anwendungsbereich der Papier-electrophorese für Serumproteine. *Acta Chem. Scandinavica*, **5**, n^{os} 7-8, 1020-1030, 1951 (15).
 52. SCHNEIDER (G.) et WALLENIS (G.). — *Scand. J. Clin. Med.*, **3**, 145, 1951 ; cité par WUNDERLY (C.). *Exp. Ann. Bioch. Med.*, **14**, 173-187, 1952 (23).
 53. SCHNEIDER (G.) et WUNDERLY. — *Schweiz. Med. Wschr.*, **82**, 1952 (30).
 54. SOROF (S.) and COHEN (P. P.). — Electrophoretic and ultracentrifugal studies on the soluble proteins of various tumors and of livers from rats fed-4-diméthylaminoazobenzène. *Cancer Research*, **11**, n^o 5, 376-382, Mai 1951 (71).
 55. SOROF (S.), COHEN (P. P.), MILLER (E. C.) and MILLER (J. A.). — Electrophoretic studies on the soluble proteins from livers of rats fed aminoazo dyes. *Cancer Research*, **11**, n^o 5, 383-387, Mai 1951 (71).
 56. SVENSSON (H.). — *Kolloid Z.*, **87**, 181, 1939 (15).
 57. SVENSSON (H.). — *J. Biol. Chem.*, **139**, 805, 1941 (15).
 58. TISELIUS (A.). — A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Tr. Farad. Soc.*, **33**, 524-531, 1937 (15).
 59. TISELIUS (A.). — Electrophorèse et chromatographie dans la chimie des protéines. *Ist. Sup. Sanità, Rendic., Ital.*, **13**, n^{os} 11-12, 916-937, 1950 (15).
 60. VAN OS (G. A. J.). — A simple method of analysing paper strips in electrophoresis on filter-paper. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 111-112, 1952 (15).
 61. VARGUES (R.). — La fiche réticulo-endothéliale de Sandor. Bases théoriques, principes techniques, applications pratiques. *Biologie Médicale*, XLIV, 245-297, 1955 (94).
 62. VARGUES (R.), ZERMATI (M.) et MUTIN (S.). — Le système euglobulinique des cancéreux. *Bull. Algérien de Cancérologie*, **6**, 311, 1953 (94).
 63. WINZLER (R. J.). — Plasma proteins in Cancer. *Advances in Cancer Research*, Academic Press Inc, New-York, **1**, 503-548, 1953 (93).
 64. WOLFF (R.) et MAGNIN (P.). — Remarques sur l'emploi de l'Amidoschwarz B comme révélateur des fractions de protéides obtenues par électrophorèse sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**, 925-926, 1954 (24) (58).
-

Table des Matières

	PAGES
INTRODUCTION	11
 <i>Première Partie</i>	
<i>L'ELECTROPHORÈSE SUR PAPIER</i>	13
 TITRE I. — <i>Recherches expérimentales sur la valeur de la méthode</i>	17
<i>Chapitre I.</i> — Etude des conditions opératoires.	19
<i>Chapitre II.</i> — Etude des « positions » et « mobilités ». Interprétation quantitative des électrophorèses sur papier	33
<i>Chapitre III.</i> — Etude de la valeur de la planimétrie	49
 TITRE II. — <i>Mode opératoire proposé</i>	53
<i>Chapitre I.</i> — Conditions techniques	55
<i>Chapitre II.</i> — Interprétation des diagrammes d'électrophorèse. Construction des courbes de Gauss	61
<i>Chapitre III.</i> — Etude des sérums « normaux ». .	65

Deuxième Partie

· APPLICATION DE LA MÉTHODE
D'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER
A L'ÉTUDE DES TISSUS CANCÉREUX 69

TITRE I. — <i>La méthode utilisée</i>	73
— Prélèvement	75
— Extraction des protéines tissulaires ..	75
— Conditions d'extraction	78
 TITRE II. — <i>Les résultats obtenus</i>	 81
<i>Chapitre I.</i> — Expression des résultats	83
a) Statistique générale	83
b) Localisation des tumeurs	84
c) Histologie	90
d) Influence de l'infection des lésions	91
e) Influence de l'évolutivité de la maladie.	92
<i>Chapitre II.</i> — Discussion des résultats	93
 CONCLUSIONS GÉNÉRALES	 99
BIBLIOGRAPHIE	101

IMPRIMERIE DE TRÉVOUX — J. PATISSIER.
